Aus dem Institut für Toxikologie der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. Remmer

Quantitative Beurteilung der Dimethylnitrosaminbildung aus Aminopyrin und Nitrit in niedrigen Dosisbereichen durch Quantifizierung von präneoplastischen Enzymdefekten in der Leber

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Erich Paul Gmähle
aus Ludwigsburg

1980

Aus dem Institut für Toxikologie der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. Remmer

Quantitative Beurteilung der Dimethylnitrosaminbildung aus Aminopyrin und Nitrit in niedrigen Dosisbereichen durch Quantifizierung von präneoplastischen Enzymdefekten in der Leber

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Erich Paul Gmähle
aus Ludwigsburg

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof. Dr. med. H. Haselmann
1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Kunz
(Prof. Dr. med. H. Remmer)
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. K. Botzenhart

Herrn Professor Dr. W. Kunz danke ich für die Überlassung des Themas und für die wohlwollende und fördernde Unterstützung während der Arbeit.

Bei meiner Frau und Fräulein Ulrike Heni möchte ich mich für Ihre Hilfe bei der praktischen Durchführung und Gestaltung dieser Arbeit herzlich bedanken.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1.	Chemikalien	15
2.2.	Versuchstiere und Tierhaltung	15
2.3.	Dosierungen	16
2.4.	Lebergewinnung	17
2.5.	Histochemischer Nachweis der Adenosintriphosphatase	18
2.5.1.	Färbegang für die ATPase	19
2.5.2.	Inkubationslösung	19
2.6.	Auswertung der Schnitte	2o
2.7.	Statistik	21
3.	ERGEBNISSE	23
3.1.	Versuchsplanung und allgemeine Daten zum Versuchsverlauf	23
3.1.1.	Applikation und Dosierung der Substanzen	23
3.1.2.	Allgemeinzustand und makroskopische Organbefunde	26
3.1.2.1.	Allgemeinzustand und makroskopische Organveränderungen der einzelnen Gruppen	28
3.1.2.2.	Relatives Lebergewicht	31
3.2.	Quantitative Bestimmung von Zahl und Größe enzymdefekter, präneoplastischer Veränderungen	33
3.2.1.	Bedeutung der ermittelten Parameter	33
3.3.	Präcanzeröse Veränderungen durch Aminopyrin und Nitrit	34

3.3.1. Nach 14o Tagen Fütterungsdauer 34
3.3.2. Nach 26o Tagen Fütterungsdauer 37
3.3.3. Zeit-Wirkungs Beziehung 41
3.4. Präcanzeröse Veränderungen durch 4-Amino-
-Antipyrin und Nitrit 43
3.5. Präcanzeröse Veränderungen durch DMNA 46
4. DISKUSSION 49
4.1. Zum Aminopyrin und Nitrit Versuch 49
4.2. Zum DMNA Schwellenwert Problem und der Frage
der menschlichen Gefährdung durch Nitrosamine 61
5. ZUSAMMENFASSUNG 69
6. TABELLARISCHER ANHANG 74
7. LITERATURVERZEICHNIS 82

ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLIK

ATP	Adenosin-5-triphosphat
ATPase	Adenosin-5-triphosphatase
DÄNA	Diäthylnitrosamin
DMNA	Dimethylnitrosamin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
RNS	Ribonukleinsäure
KG	Körpergewicht
IZ	Inselzahl
IF	Inselfläche = % Inselgewebe
GF	Gesichtsfeld
A	mit Aminopyrin behandelte Versuchstiere
An	mit 4-Amino-Antipyrin behandelte Versuchstiere
N	mit Nitrit behandelte Versuchstiere
A und N	mit Aminopyrin und Nitrit simultan behandelte Versuchstiere
An und N	mit 4-Amino-Antipyrin und Nitrit simultan behandelte Versuchstiere

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549627_0017

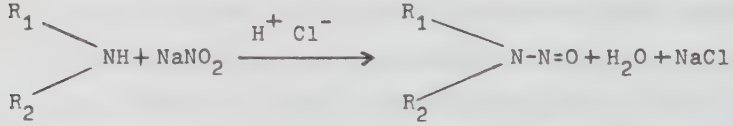
1. EINLEITUNG

Die Nitrosamine, und speziell deren einfachster Vertreter, DMNA, sind schon seit über hundert Jahren in der Chemie bekannt. Sie besaßen lange Zeit, weder in wissenschaftlicher noch in technischer Hinsicht wesentliche Bedeutung, deshalb war ihre potentielle Gefährlichkeit für den Menschen unbekannt. Es ist bezeichnend, daß DMNA noch bis vor wenigen Jahren in dem Lehrbuch der organisch präparativen Chemie von Gattermann als Literaturpräparat geführt und danach von Studenten in Praktika synthetisiert wurde. Mit der zunehmend steigenden technischen Anwendung der Nitrosamine als Schmier- und Lösungsmittel wurden gewerbetoxikologische Untersuchungen durchgeführt. Magee und Barnes (Barnes und Magee 1954; Magee und Barnes 1956) berichteten zuerst über die Hepatotoxizität und dann über die Carzinogenität von DMNA an der Ratte; durch einmalige hochdosierte Gabe von DMNA erzeugten sie akute Leberzellnekrosen und unter chronischer Applikation kleinerer Dosen beobachteten sie Lebercarzinome. Schmähl und Preussmann konnten 1959 diese Ergebnisse bestätigen und zeigen, daß das nächsthöhere Homologe dieser Reihe, DÄNA, ebenfalls stark carzinogene Eigenschaften aufweist. Kurz darauf wurde die Carzinogenität weiterer Nitrosamine und Nitrosamide nachgewiesen (Druckrey et al 1961, 1963). Die leichte Anwendbarkeit dieser ersten wasserlöslichen Carzinogene und ihre einfache chemische Struktur führte sehr schnell zu zahlreichen Studien von Metabolismus und Wirkungsmechanismus dieser Substanzen

und gaben damit der Erforschung der chemischen Carzinogenese neue Möglichkeiten.

Die Gefahr der menschlichen Exposition gegenüber diesen Stoffen schien- nach ihrer Elimination aus der Arbeitswelt- gebannt, bis Sander 1967 die Möglichkeit einer endogenen Nitrosaminentstehung im Magen wahrscheinlich machte. Aus der Überlegung, daß sich Nitrosamine bilden können, wenn sekundäre Amine und Nitrit in saurem Milieu zusammentreffen, der Magen sozusagen als chemisches Laboratorium fungiert, leitete er die Möglichkeit einer endogenen Nitrosaminbildung ab.

Die Summengleichung der Nitrosaminsynthese aus sekundären Aminen und Nitrosierungsmitteln wie Nitrit in saurem Milieu lautet:



sek. Amin Nitrit Nitrosamin

Bei einem früheren, von der gleichen Überlegung ausgehenden Versuch, in dem Druckrey (Druckrey et al 1963 a) die chronisch toxische Wirkung von Nitrit an Ratten prüfte und dabei auch eine Kombination von Diäthylamin und Nitrit verabreichte, wurden weder Schäden noch Carzinome beobachtet. Er führte das negative Ergebnis auf den zu wenig sauren pH im Mageninhalt der Ratten zurück. Sander konnte dies durch eigene pH-Messungen des Magensaftes bei Ratten widerlegen (Sander et al 1968).

Er gibt einen pH-Wert von 1,5 - 2,5 eine halbe Stunde nach Nahrungsaufnahme in Pylorusnähe an. Außerdem weist er auf die wichtige Rolle hin, die die Basizität der Amine spielt. Für die Nitrosierung eines Amins mit Nitrit gibt es ein pH-Optimum: der saure pH-Wert sorgt dafür, daß aus dem Nitritanion über salpetrige Säure und N_2O_3 das nitrosierende Nitrosylkation NO^+ freigesetzt wird; andererseits ist nur die freie Base des Amins, nicht aber deren protoniertes Salz der Nitrosierungsreaktion zugänglich. Deshalb ist eine Aminoverbindung in der Regel umso leichter nitrosierbar, je weniger basisch sie ist (was die schwere Nitrosierbarkeit des stark basischen Diäthylamin erklärt). Umgekehrt ist es aufgrund des Massenwirkungsgesetzes möglich, eine niedrige H^+ Konzentration durch hohe Nitritkonzentrationen völlig auszugleichen.

Sander und Mitarbeiter (Sander 1967; Sander et al 1968; Sander, Seif 1969; Sander, Bürkle 1969; Sander 1971; Sander, Schweinsberg 1972; Schweinsberg, Sander 1972; Sander et al 1973; Labar, Sander 1975) beschäftigten sich in den folgenden Jahren ausführlich mit dieser Möglichkeit einer Nitrosaminentstehung und ihrer Bedeutung für die Humancarzinogenese. Denn zahlreiche Pflanzeninhaltsstoffe, mikrobielle Stoffwechselprodukte, Medikamente, Aminosäuren etc. besitzen sekundäre Aminogruppen. Nitrat kommt in Lebensmitteln, im Trink-

wasser und in Pflanzen vor und wird durch bakterielle Reduktion zu Nitrit umgewandelt. Die Rolle der Bakterien bei der Nitrosaminentstehung wurde deshalb untersucht (Sander 1968); er dachte zunächst an ein Zwischenprodukt, das, im Rahmen der bakteriellen Nitratreduktion entstehend, auch bei neutralem pH-Wert sekundäre Amine in wässriger Lösung zu nitrosieren vermag.

In Fällen von chronisch-atrophischer Gastritis und Sub-Anazidität ist auch im menschlichen Magen eine bakterielle Nitratreduktion möglich. Es wurden Nitritkonzentrationen bis zu 24 mg/1oo ml Magensaft gefunden (Sander, Seif 1969). Daß beim Menschen im Magen gebildetes Nitrit unter diesen Bedingungen zur Nitrosierung von Aminen fähig ist, wurde durch Gabe von Diphenylamin nachgewiesen, aus dem das nicht carzinogene Diphenylnitrosamin entstand. Eine besondere Begünstigung der Nitrosaminbildung ergab sich, wenn durch langsames Absinken des pH-Wertes für eine bakterielle Nitritbildung und eine Nitrosaminsynthese nacheinander optimale Bedingungen geschaffen wurden. Die Inkubation von Dimethylamin und Nitrit mit Darminhalt von Ratten führte zur Bildung von DMNA (Klubes et al 1972), auch bei einem pH von 7, was die Autoren auf eine enzymatische Bildung von DMNA zurückführten. Außerdem wiesen sie auf die Stabilität von DMNA in Gegenwart von Bakterien hin.

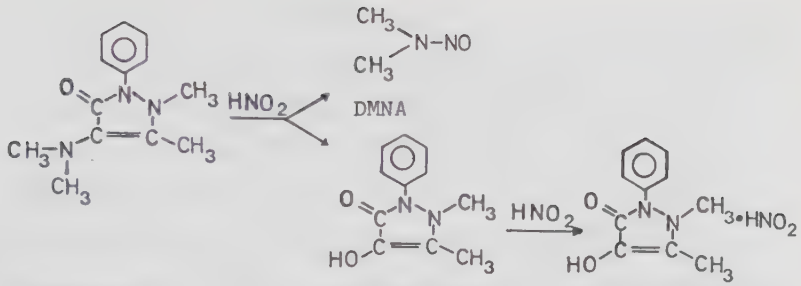
Die Ansicht, daß tertiäre Amine keine Nitrosierungs-

reaktion eingehen, da sie keine ersetzbaren Wasserstoff-Atome haben, kann man auch heute noch in Lehrbüchern finden (Beyermann 1971), obwohl schon Hein 1963 und Smith und Loeppky 1967 auf diese Reaktionsmöglichkeit für tertiäre Amine hinwiesen; sie reagieren leicht bei einem pH von 3 - 6 mit Nitritionen.
Lijinsky untersuchte die Reaktion von Nitrit und Medikamenten mit sekundären und tertiären Amingruppen. Oxytetracyclin, Aminopyrin, Disulfiram, Nikethamid, Tolazamid u.a. (Lijinsky et al1972) ergaben dabei messbare Nitrosaminmengen, wobei gerade bei den tertiären Aminen Oxytetracyclin und Aminopyrin die Ausbeute am größten war.
Labar und Sander versuchten 1975 zunächst in in vitro Versuchen, ob diese Nitrosierung auch unter physiologischen, beim Menschen zu erwartenden Bedingungen, abläuft. Sie inkubierten dazu niedrigere Aminopyrinkonzentrationen mit aus gepökeltem Fleisch und Spinat extrahiertem Nitrit mit menschlichem Magensaft. Bereits aus der Reaktion von 4 mg Nitrit (in 175 ml Extrakt aus 1oo g Schinken) und 1oo mg Aminopyrin erhielten sie dabei mg-Mengen von DMNA. Die Ergebnisse dieser in vitro Versuche wurden ergänzt durch in vivo Untersuchungen, in denen eine analoge Nitrosaminbildung bei gleichzeitiger Zufuhr von Aminopyrin und Nitrit nachgewiesen werden konnte. Sander und Labar diskutierten die Wertigkeit ihrer in vitro Ver-

suche selbst kritisch, da 1. ihre Reaktion in wässriger Lösung stattfand (was man im Magen nicht immer erwarten kann) 2. regelmäßig umgerührt wurde (eine so intensive Durchmischung der Reaktanten wird im Magen auch nicht immer stattfinden) 3. der pH konstant bei 3 lag und 4. vor allem das Reaktionsvolumen und die Konzentration der Reagentien konstant war, während im Magen die Reaktionsverhältnisse, die Verweildauer und die Volumina viel unberechenbarer und unübersichtlicher sind. Nach Friedmann z.B. liegt die Halbwertszeit von Nitrit im Mäusemagen bei 7 min. (Friedmann et al 1972). Auch Aminopyrin verläßt den Magen schnell, nach 1 min. war beim Menschen nur noch 3o-5o% der anfänglichen Konzentration nachweisbar, die Nitritkonzentration war nach 2 min. nur noch halb so groß wie zu Anfang (Labar, Sander 1975).

Bei chronischer Applikation konnten Lijinsky und Mitarbeiter (Lijinsky et al 1973; Taylor, Lijinsky 1975) schließlich auch die carzinogene Wirksamkeit des aus Aminopyrin und Nitrit entstehenden DMNA an Ratten zeigen. Durch Verfütterung von Aminopyrin und Nitrit in Dosierungen von 1 ooo bzw. 25o ppm über 3o bzw. 5o Wochen erzeugten sie hämangioendotheliale Lebersarkome bei den Tieren.

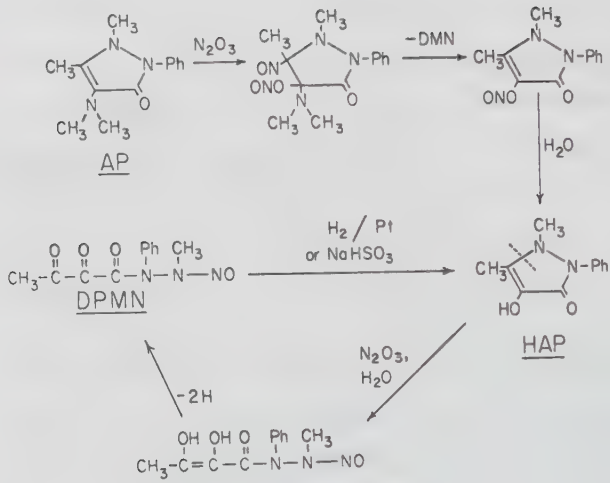
Für die Nitrosaminbildung aus Aminopyrin postulierte Lijinsky folgenden Reaktionsablauf (Lijinsky 1974):



Aminopyrin | 4-Hydroxyantipyrin | 4-Hydroxyantipyrin-nitrit

Weitere zwölf, hauptsächlich chronisch eingenommene Medikamente wurden daraufhin untersucht, ob sie mit Nitrit bei optimalen pH-Werten von 3-4 Nitrosamine ergaben (Lijinsky 1974). Bei allen Medikamenten fand eine Nitrosaminbildung statt, allerdings in stark unterschiedlichem Ausmaß. Die großen Unterschiede in der Ausbeute von z.B. 4o% bei Aminopyrin bis zu o,o3% bei Dextropropoxyphen waren zunächst nicht erklärlich, da der Teil des Moleküls, der die Dialkylaminogruppe enthält, in vielen Fällen sehr ähnlich ist. Mirvish versuchte dies mit der Enaminstruktur des Aminopyrin zu erklären (Mirvish et al 1974). Eine zusätzliche Rolle könnte dessen geringe Basizität (pk_a 5,o4) spielen. Mirvish kommt aufgrund seiner spektrographischen Ergebnisse zu einer von Lijinsky abweichenden Deutung des Reaktionsablaufs, die, neben DMNA, wie die erste Studie zur Nitrosierung von Aminopyrin (Bockmühl 1936),als weiteres Produkt das 1-Diketo-butyryl-1-phenyl-2-methyl-2-nitrosohydrazid--hydrat (DPMN) ansieht.

Formelschema:



AP : Aminopyrin

DMN : Dimethylnitrosamin

HAP : Hydroxyantipyrin

DPMN: siehe oben

Nach diesen in vitro Untersuchungen und den tierexperimentellen in vivo Versuchen war an der prinzipiellen Möglichkeit einer Bildung carzinogener Nitrosamine aus Nitrit und Arzneimitteln nicht mehr zu zweifeln. Entscheidend für die reale Bedeutung war demnach nur die Frage, ob tertiäre Amine und Nitrit in ausreichender Konzentration vorkommen. Für die Aminkomponente ist diese Voraussetzung sicher gegeben. Der Aminopyrinkonsum war durch Schmerzmittel weit verbreitet; Baumeler und Dubach

konnten 1971 in der Schweiz bei nahezu 12% von über 1 ooo ausgewählten weiblichen Personen Aminophenazon im Urin feststellen. Von den 22 meistverkauften Schmerzmitteln (Schweiz 1971) enthielten 1o Aminophenazon in Mengen zwischen 75 und 3oo mg. 1974 fanden sich in der Roten Liste noch 2oo Spezialitäten, die Aminopyrin enthielten, davon waren 1oo nicht rezeptpflichtig (Labar, Sander 1975). Aminopyrin wird in Dosierungen bis zu 3oo mg pro Tablette verabreicht. Die maximale Einzeldosis beträgt 5oo mg.

Nitrit kommt wegen seiner Verwendung als Lebensmittelzusatzstoff (in der BRD ist der Nitritgehalt des Pökelsalzes auf max. o,5 - o,6% festgelegt) und vor allem wegen seiner schon erwähnten (Seite 4) bakteriellen Bildung aus Nitrat oft in erheblichem Umfang in der Nahrung vor. Im Fleisch fanden sich max. 15o ppm Nitrit, in verdorbenem Spinat bis zu 27o ppm.

Mit der gleichzeitigen Aufnahme beider Komponenten der Nitrosaminbildung kann danach mit Sicherheit gerechnet werden. Es ist allerdings unsicher zu beurteilen, ob diese Konzentrationen, die doch erheblich unter denen der Modellversuche liegen, eine relevante Nitrosaminbildung zustande bringen. Hier brachten 1974 Boyland und Walker einen wichtigen Gesichtspunkt in die Diskussion ein; sie zeigten, daß die Reaktion von Aminopyrin und Nitrit durch das im Speichel enthaltene Thiocyanat katalysiert werden kann. Eine katalysatorische Wirkung besitzt ebenfalls

Formaldehyd, das aus dem zu Konservierungszwecken verwendeten Hexamethylentetramin entstehen kann. Bei Einwirkung dieser Katalysatoren könnte eine Limitierung durch die vergleichsweise niedrigen Nitritkonzentrationen gegenstandslos werden. Auch unter der Annahme dieser optimalen Reaktionsbedingungen ist jedoch sicher anzunehmen, daß die beim Menschen möglicherweise endogen entstehenden Nitrosaminkonzentrationen weit unter denen liegen, die nach Zufuhr relativ hoher Aminopyrin und Nitritkonzentrationen in Tierversuchen zu Tumormanifestationen führten. (Die niedrigste Dosierung lag hier bei 25o ppm Aminopyrin und Nitrit.)

Damit ist das Problem einer möglichen menschlichen Gefährdung jedoch nicht gegenstandslos. DMNA ist nachgewiesenermaßen für alle bisher untersuchten Tierspezies carzinogen. Menschliches Lebergewebe ist in der Lage DMNA metabolisch zu aktivieren (Montesano, Magee 197o) und die toxische Wirkung auf den Menschen scheint auch erwiesen (Freund 1937). An der potentiellen carzinogenen Wirksamkeit ist deshalb kaum zu zweifeln. Daraus folgt die Notwendigkeit, die reale Wirkung der für den Menschen relevanten Aminopyrin und Nitritdosen tierexperimentell zu untersuchen.

Für diese Versuche konnten allerdings nicht die herkömmlichen Kriterien wie Tumortastbefund oder Tumortod gewählt werden, da bei den erforderlichen niedrigen Dosierungen die Wahrscheinlichkeit, daß die Tiere während der Lebens-

zeit die Tumormanifestation gar nicht mehr erleben, groß ist. Zudem müßten bei konventionellen Carzinogenitätsprüfungen extrem große Tierzahlen eingesetzt werden, um eine humanpathologisch bedeutsame Krebsinzidenz noch erfassen zu können.

Zum Verständnis der angewandten Methode muß kurz auf das weitere Schicksal des exogen zugeführten, bzw. endogen im Magen entstandenen DMNA eingegangen werden. Nitrosamine sind sogenannte sekundäre Carzinogene, die, um ihre Wirkform zu erlangen, der enzymatischen Aktivierung bedürfen. DMNA wird vor allem in der Leber, daneben auch in der Niere, der Lunge und im Ösophagus (Knecht 1967; Montesano, Magee 197o) cytochrom P-45o abhängig am α-C Atom hydroxyliert und der Hydroxyalkylrest als Formaldehyd abgespalten. Daran schließt sich eine Umlagerungsreaktion an, wobei aus dem Monoalkylnitrosamin ein Alkyldiazohydroxid wird, welches schließlich unter H-Aufnahme in H_2O, N_2 und ein reaktives Carbeniumion zerfällt, das celluläre Makromoleküle wie Nukleinsäuren und Proteine alkyliert. Das Schlüsselereignis des Canzerisierungsprozesses besteht nach dem heute allgemein angenommenen Konzept in der Alkylierung kritischer DNS-Anteile des Zellgenoms. (Wahrscheinlich durch Bildung von 6-O-alkyl--Guanin.) Werden diese strukturell modifizierten Abschnitte vor der nächsten Replikation nicht repariert, so können falsch codierte DNS-Sequenzen entstehen und irreversibel festgeschrieben werden. Das führt zu Änderungen,

meist zum Verlust genetischer Informationen und damit zu somatischen Mutationen. Diese führen zum Ausfall verschiedener Enzyme; sie äußern sich als maligne Transformation, wenn Zellwachstum und Zellteilung kontrollierende Systeme betroffen sind.

Für den Ausfall eines Enzyms ist nach Berechnungen von Scheerer und Emmelot (1976) ein spezifischer Treffer erforderlich. Nach mathematischen Analysen der Ergebnisse dieser und vorausgegangener Arbeiten (Stöckle 1979; Schuster 1978) sind für den vollständigen Ausfall der ATPase mindestens zwei Treffer in einer diploiden Zelle nötig.

Druckrey stellte schon 1963 (Druckrey et al 1963b) bei Analysen der Dosis-Zeit-Beziehung der DÄNA-Carzinogenese eine auffallend geringe Streuung fest und folgerte daraus, daß für die Transformation eine größere Zahl von Treffern- nach seiner Annahme etwa 1oo pro Zelle- erforderlich sind. Überlegungen von Scherer und Emmelot (1976) führten zur Annahme, daß dafür ca. 6 Treffer pro Zelle ausreichen. Aus allen Annahmen geht jedoch sicher hervor, daß die Transformation eine wesentlich größere Trefferzahl benötigt, als der Enzymausfall. Daraus folgt, daß bei Einwirkung einer bestimmten Carzinogendosis enzymdefekte Zellen früher und in größerer Zahl als transformierte Zellen auftreten und daß zwischen beiden Ereignissen eine definierte trefferstatistische Korrelation besteht. Die Bestimmung von Enzymdefekten ist deshalb geeignet, die

Wirkung chemischer Carzinogene in sehr niedrigen Dosierungen und in kurzen Einwirkungszeiten quantitativ zu beurteilen. Als für diese Untersuchung geeignete Enzyme haben sich vor allem die histochemisch darstellbaren Enzyme Gluc-6-Pase und ATPase erwiesen.

Weber und Cantaro (1955) fanden, daß in den meisten experimentell erzeugten Lebercarzinomen der Ratte die Gluc-6-Pase fehlte. Die Untersuchungen von Friedrich-Freksa und Mitarbeiter (Gössner und Friedrich-Freksa 1964; Friedrich-Freksa, Gössner und Börner 1969; Friedrich-Freksa, Papadopulu und Gössner 1969) zeigten, daß enzymdefekte Carzinome aus enzymdefekten, scharf abgrenzbaren Zellbereichen entstehen, die mit enzymhistochemischen Methoden schon sehr frühzeitig in der präcanzerösen Phase nachweisbar sind. Diese lichtmikroskopisch von ihrer Umgebung nicht abgrenzbaren Zellareale wurden Inseln genannt. Die monoklonale Entstehung der Inseln konnten Scherer und Hoffmann (1971) durch autoradiographische Methoden wahrscheinlich machen. Schauer und Kunze fanden 1968 ein gleichartiges Verhalten der Nucleosid-5-Triphosphatasen (ATPasen). Die ATPase Inseln zeichnen sich durch besonders scharfe Abgrenzbarkeit gegenüber der Umgebung aus und lassen sich deshalb besonders leicht quantifizieren.

Stöckle erbrachte durch quantitative Auswertung dieser ATPase freien Inseln (Stöckle 1979) den Nachweis, daß die Dosis-Zeit Abhängigkeit der Inselentwicklung mit der Dosis-Zeit Abhängigkeit der Tumormanifestation vollständig

übereinstimmt. Es ist deshalb erlaubt, von Zahl und Größe präneoplastischer Enzymdefekte auf die carzinogene Wirksamkeit zu schließen.

Mit dieser Methode der quantitativen Inselauswertung sollte in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von Aminopyrin und Nitrit in niedrigen Dosisbereichen allein und in Kombinationen untersucht werden. Die dabei in der Leber zur Wirkung kommende Menge des endogen gebildeten DMNA sollte durch Vergleich mit peroraler Applikation sehr niedriger DMNA Dosen abgeschätzt werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Chemikalien:

- Adenosin-5-triphosphat — Boehringer, Mannheim
- Aminopyrin, Aminophenazon (1-Phenyl-2,3-dimethyl-4-dimethylamino-5-pyrazolon) Pyramidon^{R} — Hoechst, Frankfurt
- 4-Amino-Antipyrin (1-Phenyl-2,3-dimethyl-4-Amino-5-pyrazolon). Formeln siehe S. 43. — Fluka AG, Buchs, Schweiz
- Na-nitrit krist. ($NaNO_2$) pro analysi — Merck, Darmstadt
- DMNA — Merck, Darmstadt
- Entellan^{R} — Merck, Darmstadt

2.2. Versuchstiere und Tierhaltung:

Versuchstiere waren weibliche Wistarratten der Firma Ivanovas aus Kisslegg (Allgäu). Weibliche Tiere hatten sich in früheren Versuchen als empfindlicher für Nitrosamine erwiesen als männliche (Schieferstein et al 1974). Nach 5-tägiger Eingewöhnungszeit an die Stallbedingungen wogen die Tiere durchschnittlich 1oo g. Sie erhielten Altromin Standardfutter der Firma Altrogge, Brackwede. Da es sich durchweg um Langzeitversuche handelte, kam als Applikationsart nur die Verabfolgung der Stoffe im Trinkwasser in Frage. Für die genaue Einstellung der DMNA Applikation, die in mg/kg KG erfolgte, war eine anfangs wöchentliche, später 14-tägige Kontrolle von KG

und Trinkmenge erforderlich. Eine Stammlösung von 1 mg/kg KG wurde wöchentlich, je nach voraussichtlichem Bedarf neu angesetzt. Alle DMNA Lösungen wurden in braunen Glasflaschen (um eine Zersetzung durch UV Licht zu verhindern) im Kühlraum aufbewahrt.
Die Aminopyrin bzw. 4-Amino-Antipyrin und Nitritlösungen wurden ebenfalls in braunen 2-Liter Glasflaschen im Kühlraum aufbewahrt und je nach Bedarf angesetzt. Die Mischung der Kombinationen erfolgte beim täglichen Einfüllen in die Tränkflaschen für die einzelnen Käfige. Für die Aminopyrin und Nitritversuche wurden 1o, für die 4-Amino-Antipyrin und DMNA Reihen je 5 Tiere pro Gruppe eingesetzt. Die Applikationsdauer betrug bei den 4-Amino-Antipyrin und Nitrit sowie bei den DMNA Gruppen 15o Tage; die Aminopyrin und Nitrit Tiere kamen in zwei 5-er-Gruppen nach einer Fütterungsdauer von 14o bzw. 26o Tagen zur Schlachtung.

2.3. Dosierungen:

1. Aminopyrin und Nitrit je 1 ooo ppm
2. Aminopyrin und Nitrit je 5oo ppm
3. Aminopyrin und Nitrit je 25o ppm
4. Aminopyrin und Nitrit je 1oo ppm
5. Aminopyrin 5oo ppm
6. Nitrit 1 ooo ppm
7. Nitrit 5oo ppm
8. Kontrollgruppe: erhielt H_2O ad libitum.

9. 4-Amino-Antipyrin und Nitrit je 5oo ppm
1o. 4-Amino-Antipyrin und Nitrit je 125 ppm
11. 4-Amino-Antipyrin 1 ooo ppm

12. DMNA o,1 mg/kg KG
13. DMNA o,o1 mg/kg KG
14. DMNA o,oo1 mg/kg KG
15. Kontrolle (für die Schlachtung nach 15o Tagen) erhielt H_2O ad libitum.

Die Wirkstoffapplikation wurde ohne Unterbrechung am Wochenende durchgeführt, da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, daß bei den Tiergruppen, die die höheren Aminopyrin und 4-Amino-Antipyrin Konzentrationen erhielten, sehr schnell ein Lerneffekt auftrat. Die Tiere tranken die Woche über nur sehr wenig und warteten auf das offensichtlich wohlschmeckendere Leitungswasser am Wochenende.

2.4. Lebergewinnung:

Bei Versuchsende wurden die Tiere nach 12-stündigem Hungern-, da die Enzymausfälle bei nüchternen Tieren oft besser abgrenzbar sind- mit Äther narkotisiert, gewogen und dekapitiert. Wenn nicht besonders erwähnt, kamen die Tiere 3-7 Tage nach der letzten Wirkstoffapplikation zur Auswertung.
Nach gründlicher Entblutung wurde die Leber präpariert,

entnommen, und ebenfalls gewogen. Je nach Lebergröße wurde dann sofort der gesamte große Leberlappen oder nur ein Teil von 1-2 cm^2 Grundfläche auf einem Kryostat-tischchen nach Dittes mit CO_2 aufgefroren. Die unfixierten, eingefrorenen Leberlappen wurden in einem Kryostat nach Dittes-Duspiva bei -18°C geschnitten. Es wurden jeweils zehn 1o µm dicke Schnitte in 5 verschiedenen Ebenen angefertigt, wobei der Abstand der Schnittebenen voneinander mindestens 4oo µm betrug.
Die auf einen vorgekühlten Objektträger aufgebrachten Schnitte wurden mit dem Finger angetaut und mit einem auf "kalt" eingestellten Fön getrocknet.
Außerdem wurden die Tiere sorgfältig auch auf eventuelle andere makroskopisch erkennbare Veränderungen bzw. Tumoren- speziell der Nieren- untersucht.

2.5. Histochemischer Nachweis der Adenosintriphosphatase:

Zur Darstellung der ATPase wurde die Bleisalzmethode nach Wachstein und Meisel (1956, 1957) angewandt. Das Prinzip dieser Methode besteht in dem Nachweis von Phosphat, welches enzymatisch von ATP abgespalten wird. Das pH-Optimum der durch Magnesiumionen aktivierbaren ATPase liegt bei pH 7,2.
Das abgespaltene Phosphat wird mit Bleiionen ausgefällt. Durch Umfällung mit Amoniumsulfid wird das weiße Pyromorphit $Pb_5(PO_4)_3Cl$ (Pratt, 1954) in das schwarze, gut sichtbare und unlösliche Bleisulfid überführt.

2.5.1. Färbegang für die ATPase:

- Vorfixieren in o,5%igem Glutaraldehyd — 5 sec.
- Wässern in fließendem Wasser — 1 min.
- Inkubation bei 37°C (Lösung s.u.) — 5o-6o min.
- Spülen in Leitungswasser — 5 sec.
- Fällung in o,75%igem Ammoniumsulfid (bis zur deutlichen Braunfärbung des Schnittes) — ca. 1-1,5 min.
- Spülen in Leitungswasser — 5 sec.
- Fixieren in 5%igem Glutaraldehyd mit Zusatz von 5% Eisessig — 15 min.
- Wässern in fließendem Wasser — 5 min.
- Kernfärbung mit Mayer's Hämalaun — 3-5 min.
- Bläuen in fließendem Wasser — 15 min.
- Alkoholreihe 3o%, 5o%, 7o%, 3x1oo% — je 1 min.
- 2 x Xylol — je 2 min.
- Eindecken in Entellan^{R}

2.5.2. Inkubationslösung:

- 1oo ml o,2 M Trismaleatpuffer pH 7,2 (mit 1 N NaOH eingestellt)
- 11o ml Aqua dest.
- 17 ml 2%iges Bleinitrat
- 25 ml o,1 M Magnesiumsulfat
- 125 mg Adenosin-5-Triphosphat.

Die Lösung wird 15 min. an der Wasserstrahlpumpe entlüftet und auf 37°C temperiert.

2.6. Auswertung der Schnitte:

Die quantitative Auswertung erfolgte nach der von Stöckle (1979) vorgeschlagenen Meßmethode. Von den 2 Schnitten pro Objektträger wurde jeweils nur einer ausgewertet (der zweite Schnitt der "gleichen" Ebene war nur als Reserveschnitt gedacht und konnte in manchen Fällen dazu dienen, fragliche Inseln als Artefakte zu erkennen, wenn sie nur auf einem Schnitt nachzuweisen waren).
Das Präparat wurde 125-fach vergrößert auf eine Integrationsmattscheibe (Integrationsplatte II 1oo/25 von Zeiss) projiziert. Siehe Abb. 1

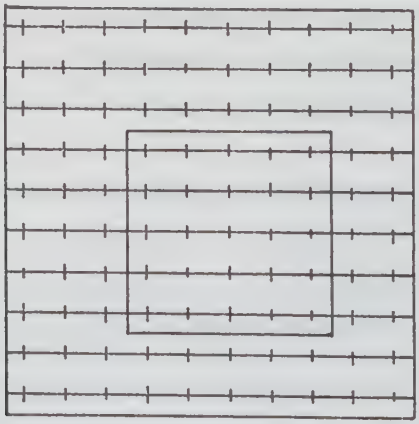


Abb.1: Zeiss Integrationsplatte II 1oo/25
Die Daten zu dieser Mattscheibe bei 125-facher Vergrößerung lauten (Eichung mittels eines Objektmikrometers):

Strichabstand (Projektionsplatte) = 76,8 µm (Präparat)

Seitenlänge des Gesichtsfeldes = o,77 mm

Gesichtsfeldfläche = o,59 mm^2

Durch mäanderförmiges, lückenloses Ausmessen (Verschieben des Präparates um jeweils o,77 mm) werden mit einem manuellen Zählgerät die Anzahl der Gesichtsfelder pro Präparat (GF), die Inselzahl (IZ) und alle auf Inseln fallenden Strichmarkierungen (IF="Inselfläche") gezählt. Der Quotient $\frac{IZ}{GF}$ ergibt die durchschnittliche Inselzahl pro Meßfeld. Zur Berechnung der IZ/cm^2 wird dieser Wert mit dem Faktor 169 multipliziert. Der Quotient $\frac{IF}{GF}$ ergibt direkt den prozentualen Anteil von Inselgewebe am Gesamtgewebe.

Nach Stöckle erreicht man zwar schon durch Auszählen von 5o Meßfeldern eine hinreichende Genauigkeit, da die Streuung jedoch auch von der Inselhäufigkeit abhängt, empfiehlt er selbst, das gesamte Präparat auszuzählen. Die Mindestzahl der ausgewerteten GF betrug 2oo.

2.7. Statistik:

Die statistische Beurteilung der Ergebnisse erfolgte durch Berechnung der Mittelwerte und ihrer Streuung, sowie durch Signifikanzprüfung zweier Vergleichsreihen (behandelte Tiere gegen Kontrolltiere) durch den t-Test (nach Student). Der Konfidenzbereich der Differenz zweier Mittelwerte wurde mittels graphischer Tafeln (Koller 1969) ermittelt. Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit

von $p < 0{,}01$ wurden als hochsignifikant, solche mit $p < 0{,}05$ als signifikant bezeichnet.
Die Regressionsanalyse des Anstiegs von IZ/cm^2 nach 14o Tagen bei verschiedenen Dosierungen von Aminopyrin und Nitrit ergab Signifikanz bei $p = 0{,}05$.

3. ERGEBNISSE

3.1. Versuchsplanung und allgemeine Daten zum Versuchsverlauf

Wie in der Einleitung eingehend begründet wurde, wurden die Untersuchungen von Aminopyrin, Nitrit sowie Aminopyrin und Nitrit in verschiedenen Dosierungen durchgeführt.
Zur Klärung der Frage, ob eine mögliche Wirkung auf die Nitrosierung der Dimethylaminogruppe von Aminopyrin zurückzuführen ist, oder ob dafür andere Nitrosoderivate (siehe Seite 8) mitverantwortlich sind, wurde 4-Amino-Antipyrin isoliert und ebenfalls in Kombination mit Nitrit mituntersucht.
In einer dritten Versuchsreihe wurde die Wirkung von peroral zugeführtem DMNA geprüft, um eine quantitative Abschätzung der endogenen entstehenden DMNA Dosen zu ermöglichen.

3.1.1. Applikation und Dosierung der Substanzen

Wegen der langen Versuchsdauer wurden alle Substanzen mit dem Trinkwasser zugeführt. Da die Tiere das mit Wirkstoff versetzte Wasser ad libitum erhielten, gab es vor allem bei den höheren Dosierungen von Aminopyrin und Nitrit doch beträchtliche Unterschiede in den täglichen Trinkmengen. Deshalb wurden die verbrauchten Mengen genau registriert, sodaß eine exakte Dosisangabe möglich war.
(Tabellen A und B)

Tabelle A

Gruppe (Dosisangaben in ppm)	⌀ Trinkmenge pro Tier und Tag in ml	⌀ Tagesdosis pro Tier und Tag in mg x	Dosis in mg/kg KG bei Versuchsende
1 ooo A und N	17,o5	17,o	17o
5oo A und N	2o,14	1o,1	5o,5
25o A und N	29,24	7,3	29,2
1oo A und N	33,85	3,4	13,6
5oo A	27,78	13,9	55,6
1 ooo N	32,59	32,6	13o,4
5oo N	35,56	17,8	71,2
Kontrolle	37,o	-	-

Die Gesamtdosis der verabreichten Aminopyrin und Nitrit Mengen betrug bei der 1 ooo A und N Gruppe nach 48 Tagen je 818 mg A und N. Die restlichen Dosisangaben siehe Tabelle B.

Tabelle B

Gruppe (Dosisangaben in ppm)	Gesamtdosis nach 14o Tagen		Gesamtdosis nach 26o Tagen	
	in mg	in mg/kg KG	in mg	in mg/kg KG
5oo A und N	1 34o	6 7oo	-	-
25o A und N	1 o5o	4 2oo	2 o5o	8 2oo
1oo A und N	44o	1 76o	84o	3 36o
5oo A	2 ooo	8 ooo	4 ooo	16 ooo
1 ooo N	4 4oo	17 6oo	8 4oo	33 6oo
5oo N	2 4oo	9 6oo	4 4oo	17 6oo

x Bei den Kombinationen bedeutet dies je...mg A und ...mg N.

Das heißt, nach 12o Tagen wurde ungefähr die Verdoppelung der Gesamtanfangsdosis erreicht.

Diese Dosen wurden gewählt, weil nach den Untersuchungen von Lijinsky und anderen in diesen hohen Dosisbereichen (1 ooo und 5oo ppm) sicher mit dem Auftreten von Tumoren zu rechnen war. Bei 25o ppm, bei sehr langer Versuchsdauer traten noch bei etwa 5o% der Tiere Tumoren auf. Bei den darunterliegenden Dosen mit fraglicher carzinogener Wirksamkeit war nur noch mit dem Auftreten präneoplastischer Veränderungen zu rechnen. Diese Dosisgruppe war von besonderem Interesse, weil sie, wie der nachfolgende Dosisvergleich zeigt, im Bereich einer möglichen menschlichen Exposition liegt.

Bei Zufuhr von 25o ppm Aminopyrin und Nitrit bekommt ein Tier von durchschnittlich 25o g KG hier täglich je 7,3 mg Aminopyrin und Nitrit. Das entspricht ungefähr 3o mg/kg KG. Nimmt ein Mensch von 7o kg KG 3 x täglich die max. Einzeldosis von o,5 g Aminopyrin, d.h. 1,5 g Aminopyrin pro die auf, so entspricht dies ungefähr 21 mg/kg KG. Eine Zufuhr von 1oo ppm Aminopyrin und Nitrit, d.h. je 3,4 mg entspräche einer menschlichen Aminopyrindosis von 9oo-1 ooo mg pro die.

Die Nitritdosierung ist in der 25o ppm Gruppe mit 3o mg/kg KG beim Tier im Vergleich zu den menschlichen Verhältnissen relativ hoch gewählt. Im menschlichen Speichel sind ca. 1o mg/l Nitrit enthalten (Preussmann 1975) und die exogene Zufuhr liegt bei 1,5 mg pro Tag (Sander 1967), d.h. die Ge-

samtzufuhr beträgt ca. 15 mg pro Tag (≙ o,2 mg kg/KG). Bei 1oo ppm Nitrit ist die Nitritzufuhr zwar auch noch relativ hoch, aber in Einzelfällen durchaus erreichbar. Allerdings können niedrige Nitritkonzentrationen durch die Anwesenheit von Katalysatoren wie Chlorid und Thiocyanat (Boyland, Walker 1974) ausgeglichen werden.— Eine andere Frage ist die Transponierung der Versuchsdauer auf menschliche Verhältnisse. Geht man von einer durchschnittlichen Lebenserwartung der Ratte von 9oo Tagen und beim Menschen von 7o Jahren aus, so würden 14o Versuchstage ungefähr 1o Jahren und 26o Versuchstage ungefähr 2o Jahren kontinuierlicher Aminopyrineinnahme beim Menschen entsprechen.

3.1.2. Allgemeinzustand und makroskopische Organbefunde

Der Allgemeinzustand der Tiere war in Abhängigkeit von der Dosierung bei den einzelnen Tieren sehr verschieden. Das zeigt sich bereits an dem einfachen, aber aussagekräftigen Parameter der Gewichtsentwicklung (siehe Abb. 2). Hier war eine deutliche Retardierung der Gewichtszunahme bei den zwei höchstdosierten Gruppen auffällig. Bei den A und N 1 ooo ppm Tieren zeigte sich auch die typische Reaktion auf toxische Dosen; zuerst ein Gewichtsabfall und nur sehr zögernde Erholung. Auch hieraus ergibt sich also in Übereinstimmung mit den Absterbedaten und der Carzinomentwicklung, daß realistische Dosierungen zur

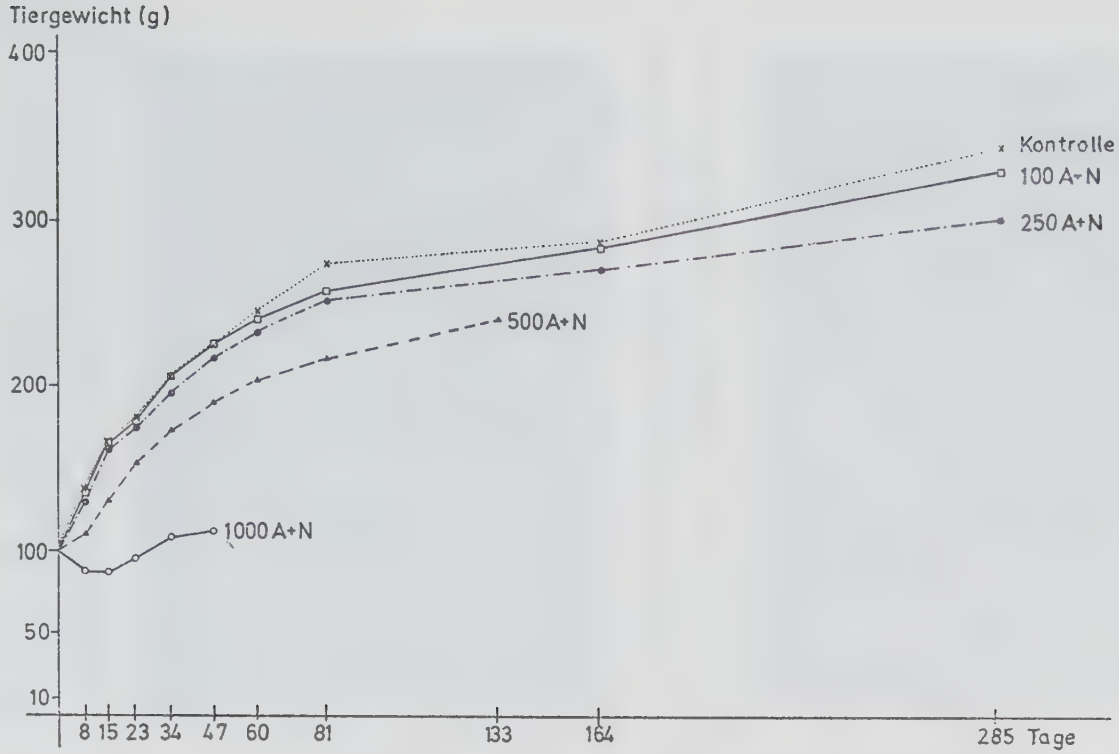


Abb. 2: Körpergewichtsentwicklung der Tiere. Dosierungsangaben in ppm.

Carzinogenitätsprüfung max 25o ppm A und N betragen dürfen, um nicht in toxische DMNA Dosisbereiche zu gelangen. Der besseren Übersicht wegen wurden die Kurven der Nitritdosen 5oo und 1 ooo ppm, sowie die der A 5oo ppm Gruppe weggelassen. Sie zeigten keine signifikante Abweichung gegenüber den Kontrollen und lagen alle über der 25o A und N Kurve.

3.1.2.1. Allgemeinzustand und makroskopische Organveränderungen der einzelnen Gruppen

- 1 ooo ppm A und N

Diese Gruppe war nur als Pilotgruppe gedacht, um frühzeitig toxische und carzinogene Auswirkungen zu erfassen und somit auch einen Anhaltspunkt für die Versuchsbeendigung zu gewinnen. Bei Dosierung von A und N in dieser Höhe entstehen offensichtlich stark toxisch wirkende DMNA-Mengen. Nach 43 Tagen war nur noch die Hälfte der 1o angesetzten Tiere am Leben. Deshalb wurde nach 47 Tagen der Rest der Tiere getötet. Die Tiere sahen allgemein dystroph aus, hatten ein struppiges Fell und starkes Untergewicht. Die inneren Organe, vor allem die Leber, waren klein und düsterrot verfärbt.
Makroskopisch fanden sich weder Leber- noch Nierentumoren und histologisch waren keine Inseln nachweisbar, sondern sogenannte "Straßen" von enzymfreiem Gewebe (siehe Foto 1), um einen Ausdruck von Papadopulu zu verwenden. Diese "Straßen" gehen von dem Gebiet um die Zentralvenen aus und

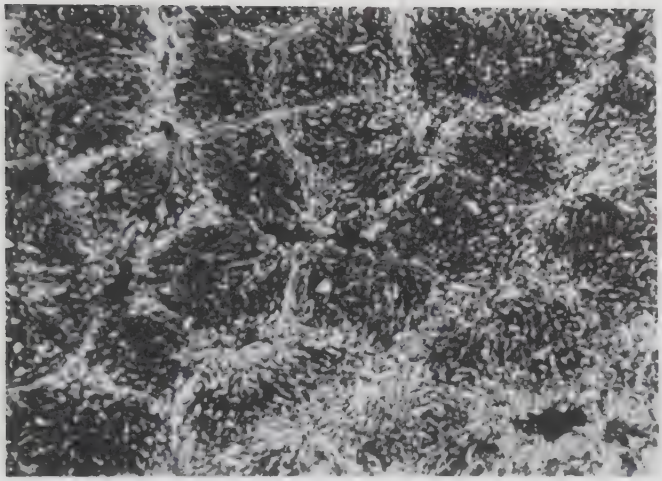


Foto 1: Enzymfreie "Straßen" nach toxischen Dosen von Aminopyrin und Nitrit (1 ooo ppm).

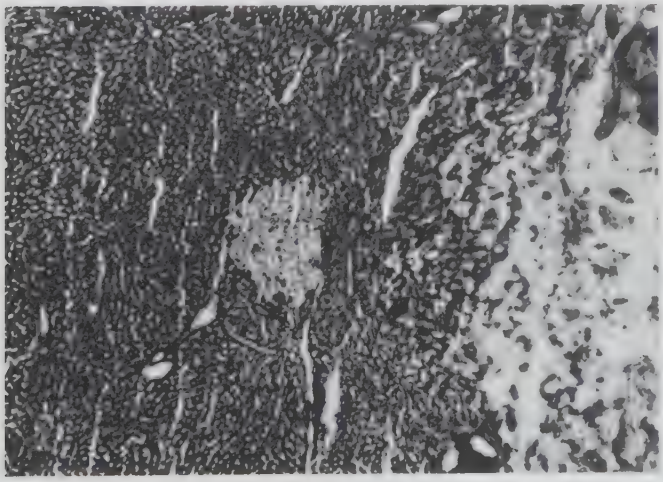


Foto 2: Präneoplastische Insel neben Hämangioendotheliom unter 5oo ppm Aminopyrin und Nitrit.

2oo µ

konfluieren schließlich. In den peripheren Gebieten des Leberläppchens um die Glisson'schen Kapseln herum bleibt die Enzymreaktion noch erhalten. Die Straßenbildung ist zum Teil reversibel nach Absetzen der Wirkstoffe und beruht in erster Linie auf der toxischen Wirkung des entstandenen DMNA.

- 500 ppm A und N

Auch bei diesen Tieren entstanden offensichtlich größere DMNA Mengen. Nach 126 Tagen (ungefähr 18 Wochen) war die Hälfte der Tiere tot. Zwei dieser Tiere konnten postmortal noch untersucht werden. Die Todesursache lag bei beiden in einer Blutung in dem Bauchraum aus oberflächlich gelegenen, blutgefüllten "Leberzysten". Alle nach 140 Tagen untersuchten Tiere zeigten ebenso wie die vorher verstorbenen große Unregelmäßigkeiten der Leberoberfläche mit mehreren makroskopisch sichtbaren Knoten. In einem Fall war ein Leberlappen durch eine 2 x 2 x 1 cm messende Zyste derart aufgebraucht, daß nur noch ein Randsaum normalen Lebergewebes übrig geblieben war. Histologisch ließen sich in allen untersuchten Tieren Hämangioendotheliome der Leber neben Inseln (siehe Foto 2) nachweisen, die in einem Fall sogar in Lunge und Niere metastasiert hatten. Blutgefüllte Zysten verschiedener Größe machten einen Großteil des Tumorgewebes aus. Häufig konnte man Übergänge von einer Insel zum Carzinom mit vermehrten Mitosen und Kernpolymorphien beobachten. Sowohl bei den 500 ppm

A und N als auch bei den 25o ppm A und N Tieren fanden sich wiederholt Gallengangsproliferate, die jedoch nie maligne entartet waren.

- 25o ppm A und N

Außer einem tennisballgroßen, derben, abgegrenzten Tumor in der Subcutis eines Tieres, das sich histologisch als ein gutartiges Fibroadenom der Mamma erwies, zeigten sich bei diesen Tieren weder nach 14o noch nach 26o Tagen irgendwelche Besonderheiten. Auch bei den übrigen Gruppen fanden sich makroskopisch keine auffälligen Befunde.

3.1.2.2. Relatives Lebergewicht (Abb. 3)

Das relative Lebergewicht berechnet sich als Quotient aus Lebergewicht und Tiergewicht bei Versuchsende. Es kann einen Hinweis auf eine hyperfunktionelle Lebervergrößerung durch Enzyminduktion geben, jedoch auch durch eine kompensatorische Hypertrophie bei Leberschädigung oder durch Tumorgewebe bedingt sein. Deshalb sind in Abb. 3 nur Gruppen aufgeführt, bei denen weder Tumoren noch toxische Schäden aufgetreten waren. Der deutliche Anstieg des relativen Lebergewichts bei den zwei Gruppen 5oo A und 25o A und N muß also auf andere Ursachen zurückzuführen sein. Da Aminopyrin in dieser Konzentration (5oo ppm) zur deutlichen Funktionssteigerung des mikrosomalen Metabolisierungssystems führt, ist es naheliegend, hier eine durch Enzyminduktion be-

wirkte Lebervergrößerung anzunehmen. Da der Anstieg bei 25o A und N noch steiler ist als bei A 5oo muß hier ein zusätzlicher Effekt zur Wirkung gekommen sein. Am wahrscheinlichsten handelt es sich um eine, durch die Nitrosamineinwirkung bedingte, kompensatorische Hypertrophie. Die nahezu konstant bleibenden Werte bei der A und N 1oo Gruppe, die den Kontrollwerten entsprechen, wären dann ein Hinweis darauf, daß bei dieser Dosierungshöhe nur unwesentliche DMNA Mengen entstehen.

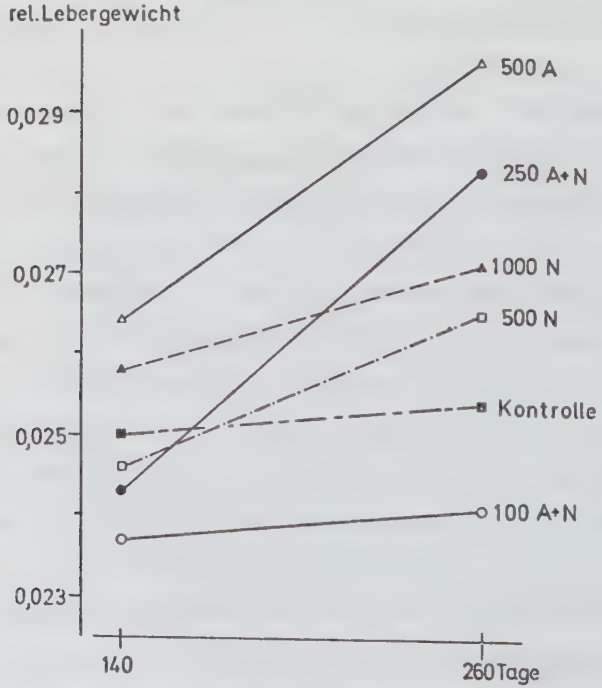


Abb.3: Relatives Lebergewicht nach 14o und 26o Tagen. Dosisangaben in ppm.

3.2. Quantitative Bestimmung von Zahl und Größe enzymdefekter, präneoplastischer Veränderungen

3.2.1. Bedeutung der ermittelten Parameter

Wie einleitend ausführlich begründet wurde, sollte bei den vorliegenden Versuchen außer den üblichen Beobachtungskriterien bei der Carzinogenitätsprüfung von Stoffen, wie Tumortod, Tumortastbefund, Gewichtsentwicklung etc., vor allem die Entwicklung präneoplastischer Veränderungen erfaßt werden. Ein Vorteil dieser Methode liegt einmal darin, daß die carzinogene Wirksamkeit in den interessierenden sehr niedrigen Dosisbereichen beurteilt werden kann und weiterhin in der exakten Quanitifizierbarkeit der Parameter wie Inselzahl und Fläche. In früheren Versuchen hatte sich gezeigt, daß für die Beurteilung der Hepatocarzinogenität die Bestimmung eines Enzyms ausreicht. Wegen ihrer homogeneren Verteilung gegenüber der Gluc-6-Pase im Leberläppchen wurde die ATPase ausgewählt. Bei genauer Durchmusterung der Schnitte ist es möglich, die Inselentstehung von der Einzelzelle an zu verfolgen. Als "Insel" gezählt wurde jedoch erst eine Gruppe von 3-4 enzymfreien Zellen. Zur Bestimmung von IZ/cm^2 und IF wurden nur Schnitte aus tumorfreiem Gewebe herangezogen. Die IZ/cm^2 sagt direkt etwas über die carzinogene Substanzwirkung aus, wenn man Störfaktoren wie das Zusammenwachsen von Inseln (was meist erst dann vorkommt, wenn sich auch schon Tumoren entwickelt haben) ausschließt. Die Inselzahl ist eine Funktion der Trefferzahl und damit

der carzinogenen Dosis und Stärke. Die Einzelinselfläche hängt von der autonomen Proliferation der enzymdefekten Zellen ab und ist deshalb eine Funktion der Zeit, die seit dem Trefferzeitpunkt vergangen ist.
Die Gesamtinselfläche als Produkt beider Größen ist damit eine Funktion von Zeit und Dosis. Sie korreliert deshalb am besten mit der ebenfalls Dosis-Zeit abhängigen Tumormanifestation. Außerdem weist sie die geringste statistische Schwankungsbreite auf. Zur quantitativen Beurteilung der Präcanzerosen hat sie sich am geeignetsten erwiesen.

3.3. Präcanzeröse Veränderungen durch Aminopyrin und Nitrit

3.3.1. Nach 14o Tagen Fütterungsdauer (Abb. 4 und 5; Tab.1 im Anhang)

Nur die höchste Dosierung, nämlich 5oo ppm A und N zeigte einen statistisch hochsignifikanten Anstieg der untersuchten Parameter. Da die Hälfte dieser Dosierungsgruppe schon nach durchschnittlich 18 Wochen gestorben war und auch alle restlichen Tiere dieser Gruppe schon Tumoren aufwiesen, wurde die Auswertung der Inseln trotzdem zur Bestimmung der Dosis-Zeit-Wirkungsbeziehung durchgeführt. Bei allen Aminopyrin und Nitrit Konzentrationen bestand eine deutliche Abhänigkeit der Inselzahl und Fläche von der Dosierungshöhe. Aufgrund der starken Streuung der Einzeltiere war jedoch ein statistisch sicherer Anstieg

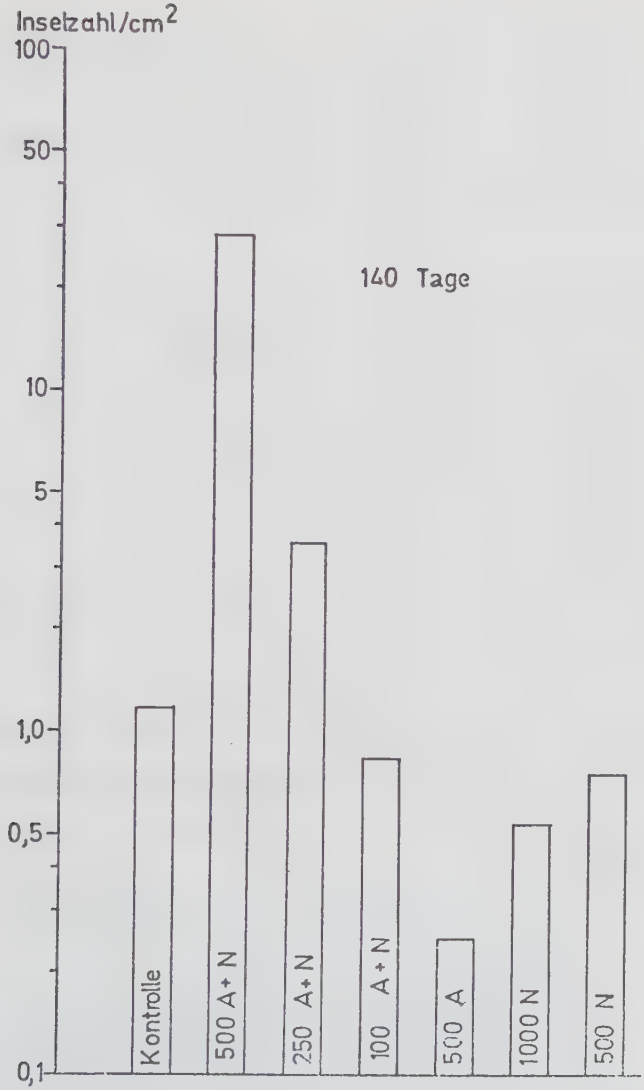


Abb. 4: IZ/cm² nach 14o Tagen Durchfütterung von Aminopyrin und Nitrit (Angaben in ppm).

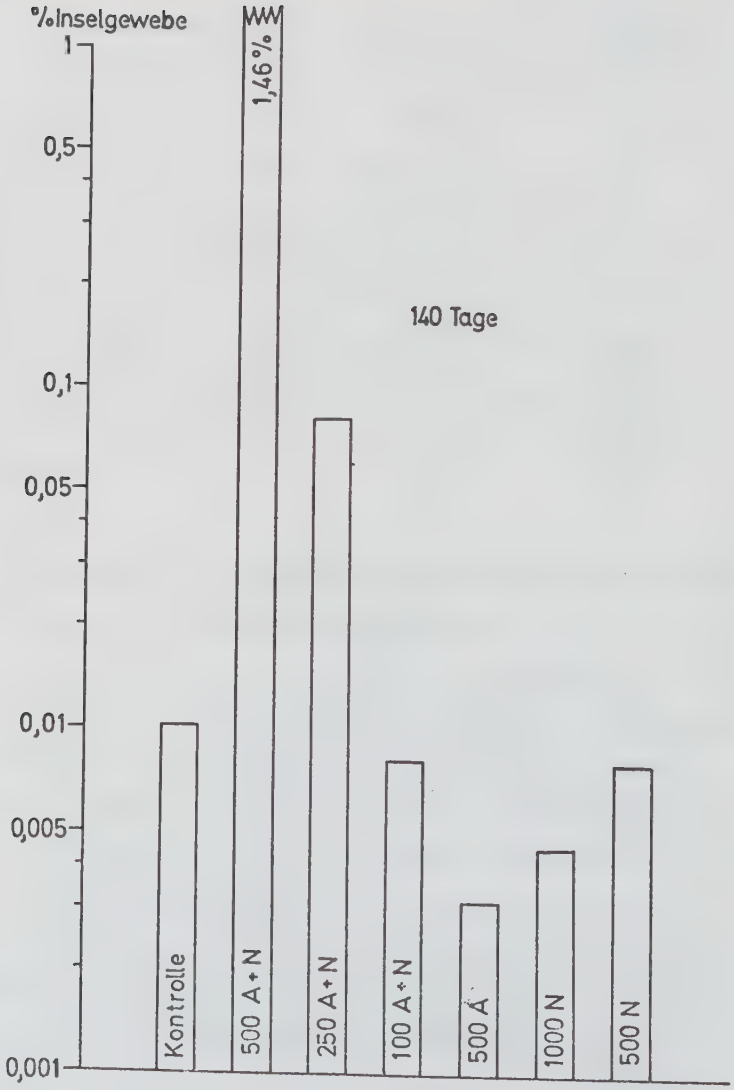


Abb. 5: % Inselgewebe nach 14o Tagen Durchfütterung von Aminopyrin und Nitrit (Angaben in ppm).

gegenüber den Kontrollwerten nur bei 5oo A und N nachweisbar. Die individuelle Schwankung erreichte manchmal bis zu 2oo%. Im Gegensatz dazu waren die Schwankungen der Werte innerhalb eines Tieres, d.h. von Schnitt zu Schnitt, viel kleiner.

Überraschend hoch waren auch die Kontrollwerte, vor allem im Vergleich mit der A und N 1oo ppm Gruppe und den Nitritgruppen, die alle unter dem Kontrollwert lagen. Allerdings rühren diese hohen Kontrollwerte nur von einem Tier her, das ca. 6 Inseln/cm^2 aufwies, wogegen sich bei den übrigen vier Tieren keinerlei Inseln zu diesem Zeitpunkt nachweisen ließen. Auffallend waren auch die niedrigen Werte in der Aminopyringruppe. Ob dies, wie für Phenobarbital nachgewiesen (Kunz et al 1978; Appel et al 1979), auf einer Induktion von cytochrom P-45o Spezies beruht oder auf andere Mechanismen, wie der Verdrängung des Carzinogens vom aktivierenden Enzymkomplex zurückzuführen ist, soll später diskutiert werden.

3.3.2. Nach 26o Tagen Fütterungsdauer (Abb. 6 und 7; Tab. 2 im Anhang)

Nach über 9-monatiger Applikation von Aminopyrin und Nitrit war die A und N 25o ppm Gruppe gegenüber der Kontrolle mit statistisch nachweisbarer Signifikanz erhöht. Diesmal wurden 8 Kontrolltiere ausgewertet, um statistisch besser abgesicherte Aussagen machen zu können,und tatsächlich waren die Kontrollwerte nach

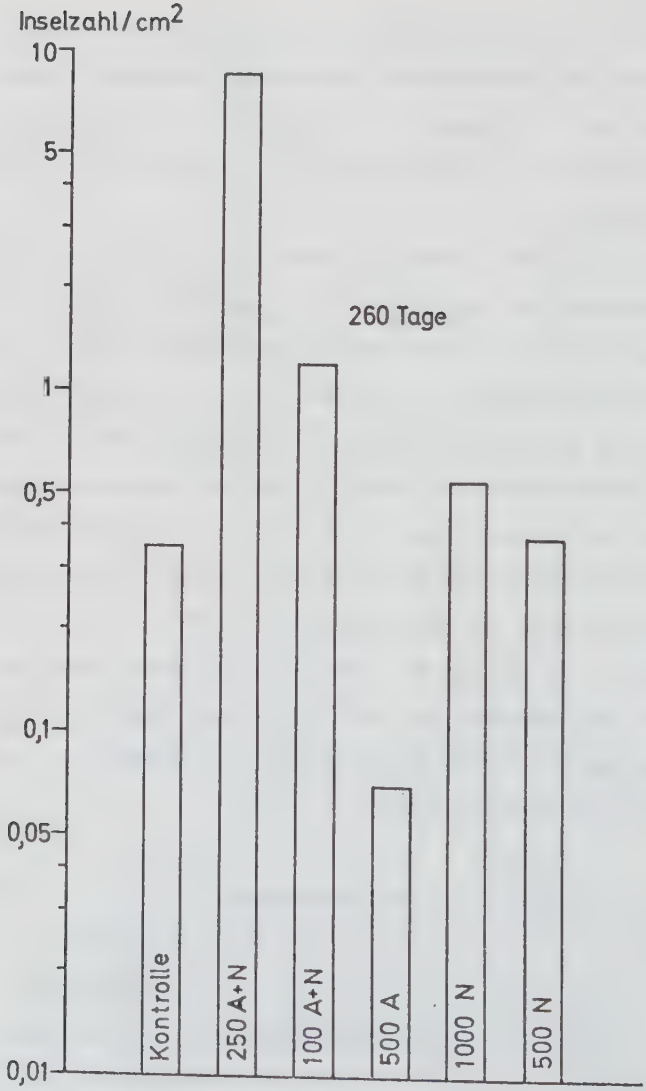


Abb. 6: IZ/cm² nach 26o Tagen Durchfütterung von Aminopyrin und Nitrit (Angaben in ppm).

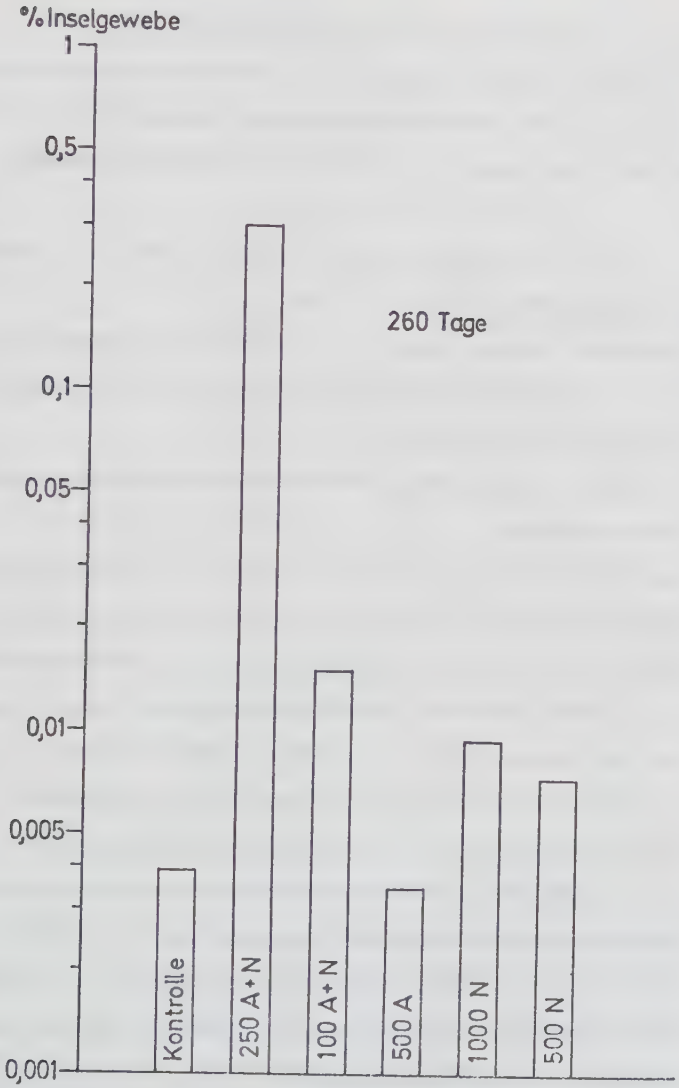


Abb. 7: % Inselgewebe nach 260 Tagen Durchfütterung von Aminopyrin und Nitrit (Angaben in ppm).

26o Tagen niedriger als nach 14o Tagen.
Die A und N 1oo ppm Gruppe war gegenüber den Werten nach 14o Tagen weiter angestiegen (siehe auch Abb. 8), aber gegenüber den Kontrolltieren noch nicht signifikant erhöht.
Die N 5oo und 1 ooo ppm Gruppen gehen in dem carzinogenen "Grundrauschen" unter.
Interessant ist, daß die A 5oo ppm Tiere, wie schon nach 14o Tagen, eine Erniedrigung von IZ/cm^2 und IF gegenüber den Kontrolltieren zeigten.
Die beiden Versuchsreihen haben zusammenfassend übereinstimmend gezeigt:

- Die Kombination von Aminopyrin und Nitrit führt in allen Dosierungsgruppen zu einer Erhöhung von Zahl und Fläche präcanzeröser Areale, zeigt aber nur in hohen Dosierungen Signifikanz gegenüber den Kontrollwerten. Ursache dafür ist die starke individuelle Schwankung, die entweder auf einer unterschiedlichen Sensibilität gegenüber den Nitrosaminen, oder auf einer sehr unterschiedlichen Nitrosierungsintensität im Magen der Tiere beruhen kann.
- Weder Aminopyrin und Nitrit allein führten, auch nicht in höhen Dosierungen von 5oo bzw. 1 ooo ppm zu einem Anstieg der Präcanzerosen; durch Aminopyrin allein wurde sogar die Inselzahl vermindert.
- Die präneoplastischen Veränderungen bei unbehandelten Kontrolltieren lagen unerwartet hoch; mögliche Ursachen dafür werden später diskutiert.

3.3.3. Zeit-Wirkungs Beziehung (Abb. 8)

Da sich die Analyse der Zeit-Wirkungs Beziehung nur auf eine Kurve aus 2 Punkten stützt, nämlich den 2 Terminen 14o und 26o Tage, nach denen die Tiere zur Auswertung kamen, muß man bei der Deutung eine gewiße Vorsicht walten lassen. Gesichert ist der prinzipiell lineare Anstieg von IZ und IF im doppeltlogarithmischen Netz. Dabei zeigt die Gesamtinselfläche bei A und N 25o ppm mit einem Anstiegswinkel von 68° die größte Anstiegssteilheit. Die IZ/cm^2 steigt mit einem Winkel von 61° an. Die Steigungen der A und N 1oo ppm Gruppen sind für IZ und IF vollkommen identisch. Von den übrigen Gruppen übersteigen nur die N 1 ooo ppm Tiere die Kontrollwerte, allerdings sehr gering. Die IZ ist hier zu beiden Zeitpunkten annähernd konstant, während die IF entsprechend dem autonomen Inselwachstum ansteigt.

Wird unter Zugrundelegung dieser mittleren Steigung für jedes Einzeltier aller Dosierungs-und Zeitgruppen der Zeitpunkt des Erreichens von 1 % IF berechnet, so zeigt sich bei doppeltlog. Aufzeichnung (entsprechend dem von Stöckle für DÄNA angewandten Verfahren) ein linearer Anstieg der Dosis-Zeit-Wirkungscharakteristik. Bei dieser Darstellung liegt auch der außerordentlich niedrige Wert für die 1oo ppm A und N Gruppe genau auf dieser Geraden. Es wird also auch bei Applikation dieser geringen Konzentrationen DMNA endogen gebildet und gelangt zur Wirkung.

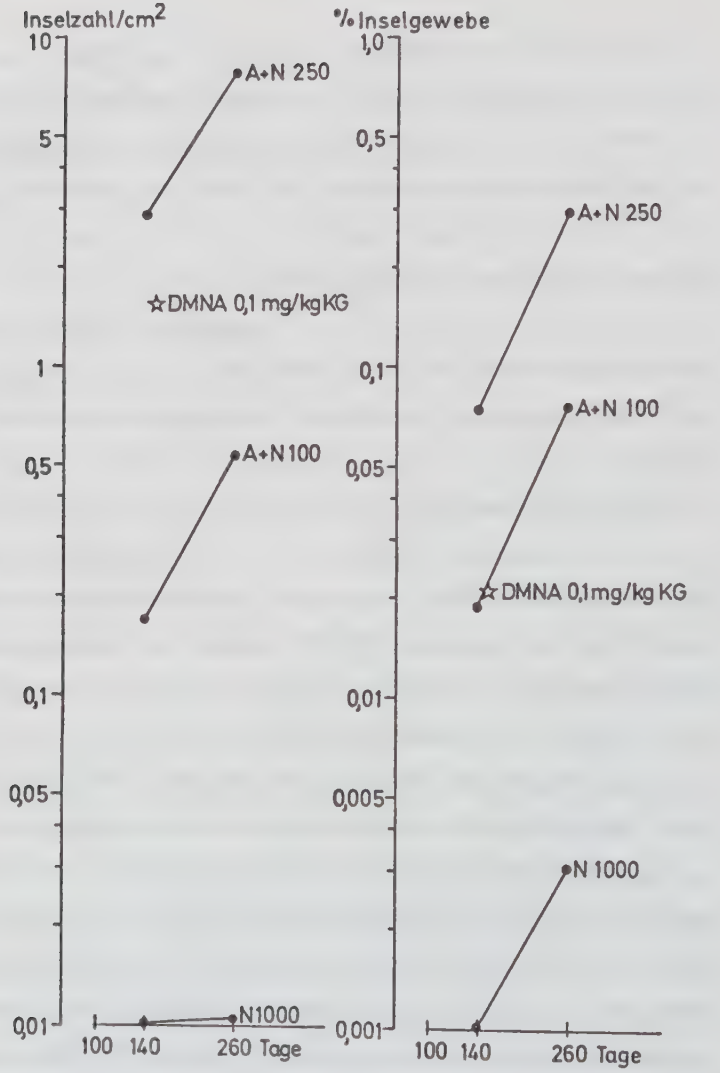


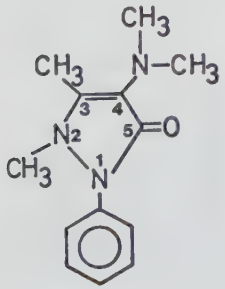
Abb. 8: Kinetik der Zeit-Wirkungs Beziehung von IZ und IF nach 14o und 26o Tagen. Aufzeichnung im doppeltlog. Netz. Bei allen Tieren wurden die Werte der Kontrolltiere abgezogen. Zusätzlich wurde noch der Wert der o,1 mg/kg KG DMNA Gruppe nach 15o Tagen eingetragen.

Da die vergleichsweise hohen Kontrollwerte sich auf die sehr niedrigen Werte nach 14o Tagen stärker auswirken, als auf die höheren Werte nach 26o Tagen, und dadurch die Steigung der Kurve beeinflußt wird, wurden die Kontrollwerte bei allen Dosierungsgruppen in Abzug gebracht.

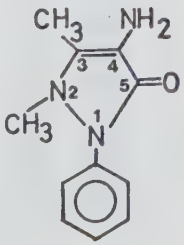
3.4. Präcanzeröse Veränderungen durch 4-Amino-Antipyrin und Nitrit (Abb. 9 und 1o; Tab. 3 und 5 im Anhang)

Zur Klärung der Frage, ob für die bei Applikation von Aminopyrin und Nitrit gefundenen präcanzerösen Veränderungen nur die DMNA Bildung durch Nitrosierung der 4-Dimethylaminogruppe verantwortlich ist, oder ob die auf Seite 8 beschriebenen und diskutierten Nitrosoderivate des Restmoleküls ebenfalls wirksam sind, wurde in einem weiteren Versuch demthyliertes Aminopyrin = 4-Amino--Antipyrin und Nitrit eingesetzt.

Formeln:



Aminopyrin



4-Amino-Antipyrin

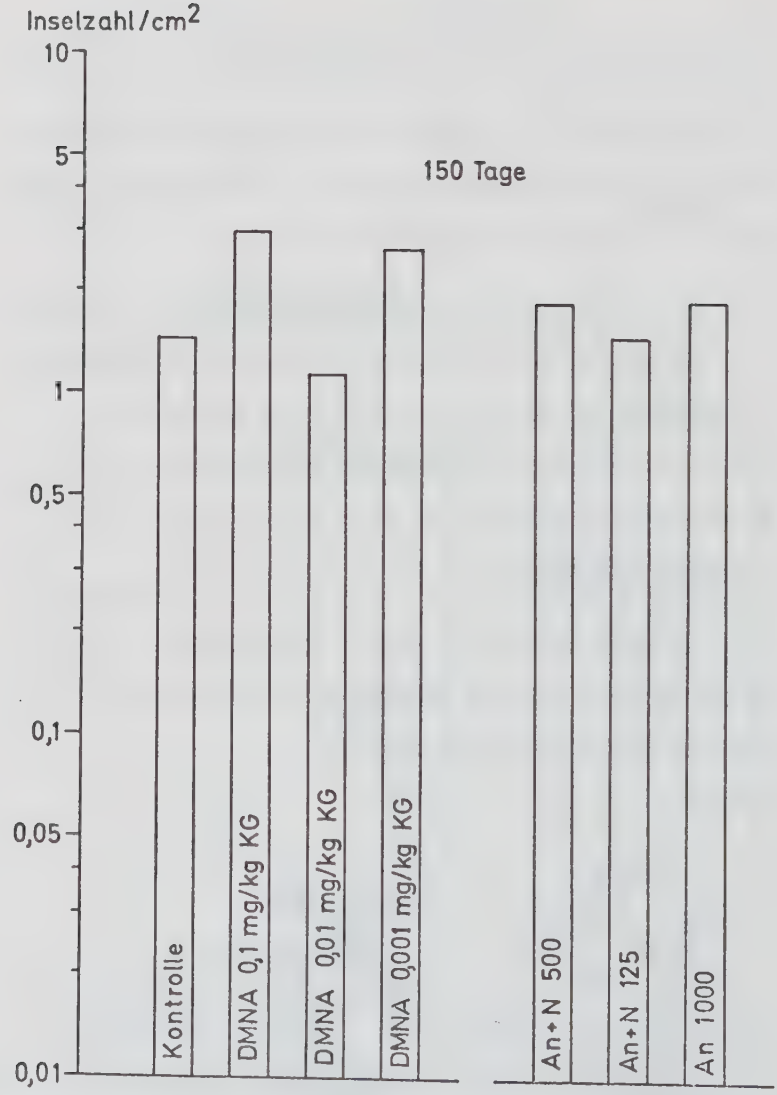


Abb. 9: IZ/cm^2 nach 150 Tagen Durchfütterung von 4-Amino-Antipyrin und Nitrit (Angaben in ppm); bzw. DMNA (Angaben in mg/kg KG).

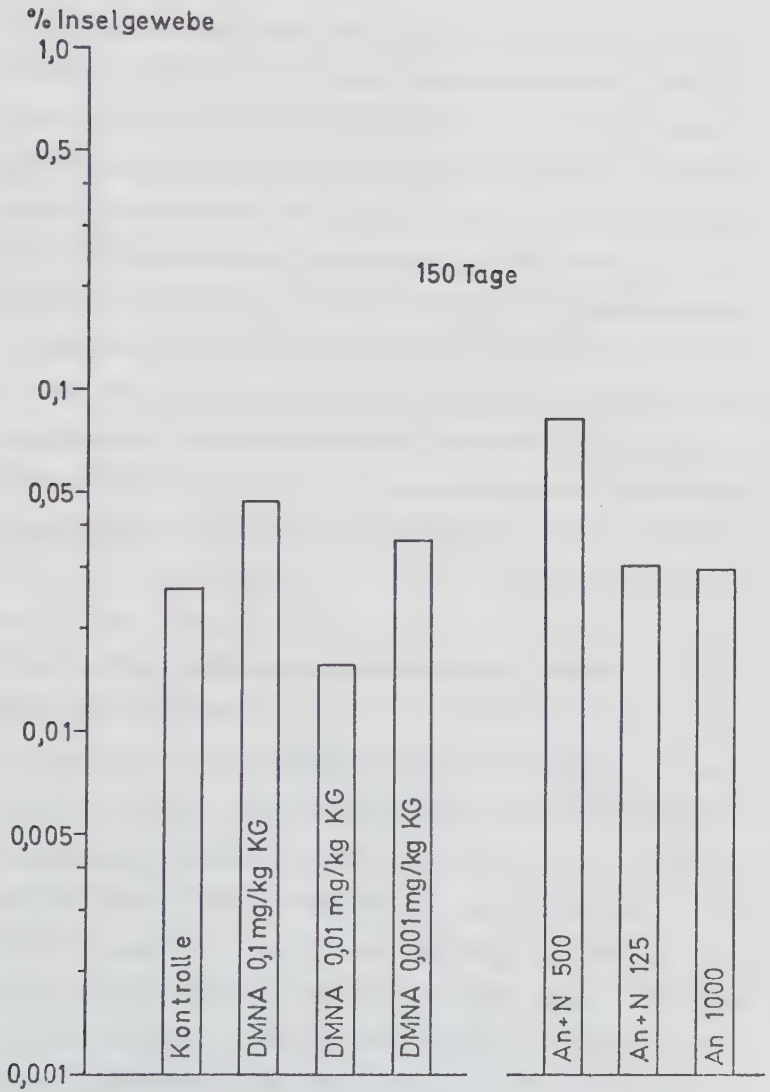


Abb. 1o: % Inselgewebe nach 15o Tagen Durchfütterung von 4-Amino-Antipyrin und Nitrit (Angaben in ppm); bzw. DMNA (Angaben in mg/kg KG).

Diese Versuchsreihe war auch von praktischem Interesse, weil ähnliche Nitrosierungsprodukte aus Novalgin^{R} entstehen, das ja jetzt als Ersatzpräparat für Aminopyrin eingesetzt wird. Bei keiner der untersuchten Dosierungen konnte ein signifikanter Anstieg der Präcanzerosen nachgewiesen werden. Bei diesem Versuch wurden absichtlich noch mehr Kontrolltiere eingesetzt, um einen sicheren Anhaltspunkt für den "Nullwert" zu erhalten. Auch hier traten regelmäßig präcanzeröse Veränderungen auf, die bestätigen, daß geringe, aber doch wirksame Carzinogenmengen auch von unbehandelten Tieren aufgenommen werden; wahrscheinlich ist dafür der Carzinogengehalt des Futters verantwortlich.

3.5. Präcanzeröse Veränderungen durch DMNA (Abb. 9 und 1o; Tab. 4 und 5 im Anhang)

Dieser Versuch sollte zunächst dazu dienen, sich aus dem Vergleich mit den Aminopyrin und Nitrit Versuchen ein ungefähres Bild über die Quantität des endogen entstehenden DMNA zu machen. Da das Interesse in erster Linie der Frage galt, ob noch geringe Aminopyrin Dosen carzinogen wirksame DMNA Mengen zu bilden vermögen, wurden die Untersuchungen mit den vergleichsweise sehr niedrigen Dosierungen von o,1 bis o,oo1 mg/kg KG durchgeführt. Weil keinerlei Hinweise für die Nitrosierungsrate in diesen Berreichen bestanden, schien es sinnvoll, eine möglichst

geringe DMNA Dosis zu wählen, die eine Beobachtung über einen langen Zeitraum, eventuell über die gesamte Lebenszeit zuließ. Da DMNA außerdem etwa nur 1/1o der Carzinogenität von DÄNA besitzt, war unter der Annahme, daß es sich hinsichtlich der Induktion präcanzeröser Inseln gleich verhalten werde, bei diesen Dosierungen mit meßbaren Enzymdefekten erst nach einem langen Behandlungszeitraum zu rechnen.

Die sehr niedrigen Dosierungen von o,1/o,o1/o,oo1 mg/kg KG entsprechen bei einem durchschnittlichen Tiergewicht von 25o g und einer täglichen Trinkmenge von 3o ml ca. o,83/ o,o83 und o,oo83 ppm DMNA im Trinkwasser (d.h. 8,3-83o ppb). Auch für die Beantwortung der Frage nach einer potentiellen menschlichen Gefährdung sind diese Dosierungen also durchaus realistisch. Werte in diesen Bereichen wurden u.a. in Nahrungsmitteln und Getränken nachgewiesen. Die in Abb. 9 und 1o dargestellten Ergebnisse demonstrieren, daß IZ und IF bei allen drei Dosierungsgruppen noch im Streubereich der unbehandelten Kontrolltiere liegen.

In der höchsten Dosierungsgruppe von o,1 mg/kg KG lagen IZ und IF allerdings um etwa 1oo% über den Kontrollwerten. Es kann deshalb nicht geschlossen werden, daß es eine Schwellendosis gibt, die durch diese niedrige Konzentration unterschritten wird. Zumindest für die höchste Dosierungsgruppe ist sicher anzunehmen, daß bei längerer Applikationsdauer eine deutlich über den Kontrollwerten liegende präcanzeröse Veränderung nachweisbar ge-

worden wäre.

Aus der Extrapolation der sehr niedrigen Inselflächenwerte kann geschlossen werden, daß die Zielgröße 1% IF nach einer etwa 2-jährigen Behandlungszeit erreicht würde.

Eine sichere Aussage zur Schwellendosisproblematik ist jedoch aus diesen Ergebnissen nicht abzuleiten, sie geben lediglich Hinweise für das erforderliche zukünftige experimentelle Vorgehen. Als sichere Aussage kann aus den Resultaten jedoch abgeleitet werden, daß die aus Aminopyrin und Nitrit entstandene DMNA Menge in der 1oo ppm A und N Gruppe unter o,1 mg/kg KG DMNA liegt (siehe auch Abb. 8).

Ein direkter Vergleich mit den Ergebnissen der Aminopyrin und Nitrit Versuche ist nicht möglich, da man es bei den 5oo und 25o A und N Gruppen mit offensichtlich deutlich höheren DMNA Konzentrationen zu tun hat.

4. DISKUSSION

4.1. Zum Aminopyrin und Nitrit Versuch

In der vorliegenden Arbeit sollte die Wahrscheinlichkeit einer potentiellen menschlichen Gefährdung durch Aminopyrineinnahme geklärt werden. Deshalb wurde die Möglichkeit einer Nitrosaminbildung und deren Folgen, vor allem die hepatocarzinogene Wirkung von DMNA untersucht. Dazu wurden präcanzeröse, enzymfreie Areale der Leber (Inseln) quantitativ nach Zahl und Ausdehnung bestimmt. Die von Stöckle (1979) nachgewiesene Übereinstimmung der Dosis-Zeit Beziehung $d \times t^{2,3} = \text{const.}$ für Präcanzerosen mit der ursprünglich von Druckrey gefundenen Gesetzmäßigkeit für Tumoren erlaubte es, aus dem Ausmaß der Präcanzerosen quantitative Rückschlüsse auf die carzinogene Wirksamkeit von Stoffen zu ziehen.

Aus der Untersuchung ausgeklammert wurde die Nebenwirkung, wegen der Aminopyrin schon 1965 in den USA verboten wurde, die Agranulocytose, deren Häufigkeit mit o,o1 bis o,86% angegeben wird (Huguley 1964). Möglicherweise besteht allerdings doch eine Verbindung zu der Nitrosaminbildung. Mirvish (1975) diskutiert die Möglichkeit, daß die Aminopyrin-Agranulocytose durch in vivo entstehendes DMNA ausgelöst wird, da schon lange bekannt ist, daß durch DMNA die Leukozytenzahl erniedrigt werden kann (Magee, Barnes 1967). Dazu würde auch die Beobachtung passen, daß bei 4-Amino-Antipyrin, das ja in der vorliegenden Untersuchung auch keinen Anstieg der Präcanzerosen mit Nitrit

bewirkte, kaum Agranulocytosen beobachtet wurden (Goodman, Gilman 1975; Palva, Mustala 197o). Die Ursache sowohl der Agranulocytose als auch der Nitrosaminbildung scheint also in der 4-Dimethylaminogruppe zu liegen. Eine andere Erklärung für die toxische Nebenwirkung des Aminopyrin vermuteten Poplawski und Uehlecke (1976) in reaktiven, während des Abbaus entstehenden Zwischenprodukten, die sich mit cellulären Makromolekülen verbinden. Sie konnten ein 3-formyl-Antipyrin sowie ein 3-methyl-4-hydroxy-5-pyrazolon nachweisen. Stafford et al (1974) fanden eine Abbaumöglichkeit über den Epoxid--Dihydrodiol-Weg. Warum allerdings Agranulocytosen nur in 1 von 4o ooo Fällen auftreten, wird damit auch nicht erklärt.

Das überraschende Ergebnis, daß Aminopyrin allein die Präcanzerosenzahl gegenüber den Kontrolltieren leicht senkte, obwohl Eisenbrand et al (1978) bei Stichproben in allen 68 untersuchten Medikamenten, die Aminopyrin enthielten, DMNA in Konezntrationen von 1o-371 µg/kg (o,o1-o,37 ppm) nachweisen konnte, läßt daran denken, daß hier eine gewiße Interferenz zwischen Aminopyrin und dem darin in Spuren enthaltenen DMNA eine Rolle spielen könnte. Zusammen mit dem Anstieg des relativen Lebergewichts wäre an eine Enzyminduktion, wie für Phenobarbital und andere Stoffe gezeigt wurde (Appel, Kunz 1978; Appel et al 1979; Schwarz et al 1979; Kunz et al 1978), von entgiftenden ,d.h. Nitrosamin inakti-

vierenden Enzymsystemen zu denken.
Auf jeden Fall ist Aminopyrin allein nicht carzinogen, auch nicht in Kombination mit dem im Speichel oder normalen Futter enthaltenen Nitrit. Der Nitrosamingehalt von Aminopyrinmedikamenten scheint vernachlässigbar zu sein, denkt man auch an neueste Berichte Preussmanns, nach denen jeder Biertrinker täglich o,7 µg Nitrosamine zu sich nimmt; dies entspräche dem Nitrosamingehalt von 7o Pyramidon^{R} Tabletten.
Die akuten und subakuten toxischen Effekte des Nitrit, wie Blutdrucksenkung, Gefäßerweiterung und Methämoglobinbildung sind seit langem bekannt und danach wurden auch die maximal zulässigen Lebensmittelkonzentrationen festgelegt. Es stellt sich nun die Frage, ob diese Konzentrationen nicht neu überdacht werden müssen, nachdem die Möglichkeit einer Nitrosaminbildung im Magen bekannt wurde. Die maximal zulässige Nitritkonzentration von 2oo ppm wird allerdings nur selten im Endprodukt auftreten, da ein Großteil des Nitrits schon während des Kochvorgangs in Form von nitrosen Gasen verdampft, sodaß durchschnittlich nur 2o ppm übrig bleiben (Issenberg 1976). Sander (1967) fand in Fleisch- und Wurstwaren Nitritrestmengen von 5-66,5 ppm. Eine weitere interessante Beobachtung zeigte, daß keine Korrelation zwischen etwaigem DMNA und Nitritgehalt von Wurstwaren bestand (Wasserman et al 1972).

Da Nitrit in wässriger Lösung sehr aggressiv und reaktionsfähig ist, liegt ein Großteil im Fleisch sowieso als gebundenes Nitrosomyoglobin vor, sodaß nur wenig freies Nitrit zur Nitrosaminbildung zur Verfügung steht. Außerdem ist die Reaktionszeit im Magen ziemlich kurz. Nach den vorliegenden Ergebnissen gibt es keine Anhaltspunkte, daß Nitrit allein, auch nicht in hohen Dosierungen, eine Gefahr darstellt. Offensichtlich waren im Tierfutter kaum biogene Amine enthalten, die mit Nitrit Nitrosamine hätten ergeben können. Ein Nitritverbot für Lebensmittel würde sicher mehr Probleme schaffen als lösen. Man denke nur an die Gefahr des Botulismus (bereits 1o µg des Toxins können für den Menschen tödlich sein). Höchstens 1/4 des Nitrits, das der Mensch zu sich nimmt, stammt aus künstlich mit Nitrit angereichertem Fisch oder Fleisch. Den Rest liefert die Natur bzw. die Kunstdüngung, die den Nitrit bzw. Nitratgehalt der Pflanzen erhöht.
Ob die oft erhöhte Nitritkonzentration im Magensaft von Patienten mit Achlorhydrie bzw. Perniziosa ursächlich mit der bei diesen Menschen erhöhten Magencarzinomrate zusammenhängt (Rudell et al 1976) scheint mir noch ein ungeklärtes Problem zu sein, vor allem da ja die Nitrosaminsynthese nur im deutlich sauren Bereich abläuft. Aber die von Zaldivar (197o; 1973 und 1977) und Cuello et al (1976) beobachtete positive Korrelation zwischen Magencarzinomhäufigkeit und Nitratdüngerverbrauch, Nitratkonzentration im Brunnenwasser und Nitratexkretion der Bevölkerung in

Chile, sowie die hohe Magencarzinomhäufigkeit in Japan, wo die Nitrat und Nitritkonzentration in Gemüse und Fischnahrung auch hoch ist, deutet wiederum auf eine ursächliche Bedeutung des Nitrit bwz. Nitrats für die Magencarzinogenese hin. Allerdings eher auf die Entstehung lokal wirksamer Nitrosamide bzw. Nitrosamine, als auf die resorptiv wirkender, die ja mit der vorliegenden Methode dann hätten erfaßt werden können.

Die Nitritkonzentrationen waren in diesem Versuch mit 1 ooo bzw. 5oo ppm Nitrit relativ hoch. Realistischer wären ca. 5o ppm Nitrit gewesen. Der Nitritgehalt im menschlichen Speichel, der durch bakterielle Reduktion von Nitrat entsteht, beträgt durchschnittlich 6 mg/l (Tannenbaum et al 1974). Von einem Expertenkomitee der WHO wurde eine tägliche Nitritaufnahme von o,4 mg/kg KG noch als zulässig angesehen. Da jedoch auch diese hohen untersuchten Konzentrationen keinen signifikanten Einfluß auf die Präcanzerosenbildung zeigten, kann man davon ausgehen, daß geringere Konzentrationen in Bezug auf ihre Hepatocarzinogenität durch Nitrosaminbildung unbedenklich sind.

In Anbetracht der komplexen Reaktionsverhältnisse in vivo haben die meisten Untersucher bisher einfach Reaktionsbedingungen geschaffen. Die Nitrosierungsreaktionen laufen nach verschiedenen kinetischen Mustern ab; oft sind es Prozesse, die mehrerer Reaktionsschritte bedürfen. Katalysatoren wie Thiocyanat und Formaldehyd, oder blokkierende Substanzen wie Ascorbinsäure und Gallensäuren

interferieren miteinander. Physikalische Besonderheiten wie Temperaturschwankungen und Inhomogenitäten im Magen, sowie die unklare Rolle, die Bakterien bei der Nitrosierungsreaktion spielen, komplizieren den Sachverhalt zusätzlich. Einer der wichtigsten Einwände gegen in vitro Versuche jedoch ist, daß das Reaktionsvolumen im Magen nicht konstant ist. Aminopyrin und Nitrit haben nur eine kurze Magenverweilzeit (siehe Seite 6). Die Diskrepanz zwischen in vivo und in vitro Versuchen zeigte sich auch schon früher: in vitro nahm die DMNA Ausbeute aus Aminopyrin und Nitrit auch bei sehr niedrigen Konzentrationen nicht ab (Taylor, Lijinsky 1975); dagegen konnten Sander und Labar (1974) bei in vivo Versuchen mit kleinen Nitritmengen nur sehr geringe Nitrosaminmengen feststellen. Um überhaupt zu einer Beurteilung aus präventivmedizinischer Sicht zu gelangen, sind allein in vivo Versuche geeignet, und auch diesen wohnt noch das Problem der Übertragung der Ergebnisse vom Tier auf den Menschen inne.
Ein Einwand gegen die gleichzeitige Verabreichung von Aminopyrin und Nitrit im Trinkwasser könnte sein, daß damit strenggenommen keine in vivo Bildung von DMNA nachgewiesen werde. Trotzdem wurde dieser Weg gewählt,um vergleichbare Nitrosaminmengen zu erhalten, da Versuche von Epstein (1971) zeigten, daß eine zeitliche Verschiebung der Applikation von Amin und Nitrit im Tierversuch die Tumorausbeute wegen der kurzen Verweildauer dieser Substanzen im Magen wesentlich reduzierte, wobei interessanterweise

dieser Effekt hauptsächlich dann auftrat, wenn zuerst Nitrit und dann das Amin gegeben wurde (und sehr viel weniger ausgeprägt war bei umgekehrter Reihenfolge). Eine Erklärung dafür könnte darin liegen, daß das aus Nitrit gebildete nitrosierende Agens bei Abwesenheit von Aminen von anderen nukleophilen Reaktionspartnern abgefangen wird und somit für die Nitrosaminsynthese verloren geht. Ebenso ergaben Versuche, bei denen Nitrit und Amine getrennt, d.h. Amin im Futter und Nitrit im Trinkwasser oder umgekehrt verabreicht wurde, oft negative Ergebnisse (Schneider et al 1977; Sander 1971; Asahina et al 1971); aber auch hier lag der Grund höchstwahrscheinlich nicht darin, daß sich bei gemeinsamer Verabreichung bereits extragastral Nitrosamine gebildet hatten, sondern in der kurzen Magenverweilzeit und damit der zu kurzen Reaktionszeit der Stoffe. Auch konnte Lijinsky et al (1973) mit gaschromatographischen Untersuchungen zeigen, daß sich nur minimale DMNA Mengen in Aminopyrin und Nitrit Gemischen sogar nach einer Woche Stehenlassen im Dunkeln gebildet hatten ($< o,1\%$ der theoretisch möglichen Menge).
Ein Problem, das die Aussagekraft der Methode etwas einschränkte, war die starke interindividuelle Schwankung von Inselzahl und Fläche bei gleicher Dosierung. Ob dies von unterschiedlicher Trinkwasseraufnahme oder von anderen Faktoren, wie pH-Unterschiede im Magen der Tiere und/oder verschiedenen Metabolisierungsgeschwindigkeiten abhängt, ist nicht zu entscheiden. Sicher liegt ein Teil der Ursache

auch darin, daß vom Grundprinzip her die Streuung bei der Inselbildung als eines 2-Treffer-Prozesses bei diploiden Zellen sicher größer ist, als die mehr Treffer erfordernde maligne Transformation einer Zelle (Druckrey et al 1963 b). Zur groben Abschätzung der entstandenen DMNA Mengen bzw. der Nitrosierungsrate kann die von Stöckle gefundene Formel $d \times t^{2,3} = F^{0,43} \times K^{2,3}$, die er für DÄNA unter Durchfütterungsbedingungen fand, angewandt werden; mit der Änderung, daß die Dosis mit dem Faktor 1o multipliziert werden muß. DÄNA ist ja ein wesentlich stärkeres Carzinogen als DMNA, obwohl die akute LD 5o mit 28o mg/kg 7 mal höher ist als bei diesem, es also eine wesentlich höhere "carzinogene Breite" aufweist. Druckrey et al (1967) berechnete unter der Annahme, daß für die symmetrischen Dialkylnitrosamine n = 2,3 sei ($d \times t^{2,3} = const.$) die Konstante als "Index der carzinogenen Wirkdosis". DMNA war im Vergleich mit DÄNA ca. 1o mal weniger wirksam. D.h., um den gleichen Effekt zu erzielen (IZ,IF) benötigt man 1o fach höhere Dosen. Die Berechnung der durchschnittlichen DMNA Dosis für die 5oo ppm A und N Tiere nach 14o Tagen Fütterungsdauer ergibt:

$$d = \frac{F^{0,43} \times 8\,5oo}{t^{2,3}} \times 1o = 1,16 \text{ mg/kg KG}$$

Umgerechnet auf den DMNA Gehalt im Trinkwasser ergäbe dies 12 - 24 ppm. Die Dosierung von 25o ppm A und N über 14o Tage ergäbe eine DMNA Dosis von o,33 mg/kg KG; 25o ppm

A und N über 26o Tage dagegen nur noch o,14 mg/kg KG. Da ja bei jungen Tieren gleiche Carzinogenmengen viel stärker als bei älteren wirken, und da bei Stöckle ausgewachsene Tiere verwandt wurden, ist eher der zweite Wert gültig; aber auch eine im Lauf der Zeit zunehmende Enzyminduktion ist nicht auszuschließen.

Bei der Dosierung 1ooo ppm A und N müssen toxische Dosen zwischen 1oo - 2oo ppm DMNA entstanden sein. Dies geht aus einem Vergleich mit der mittleren Überlebenszeit von Ratten nach toxischen DMNA Dosen hervor (Magee und Barnes 1956). Dies würde einer molaren Ausbeute von ca. 3o% entsprechen.

Lijinsky (1974) beobachtete bei Aminopyrin und Nitrit eine auf Mol bezogene DMNA Ausbeute von 3o% bei in vitro Versuchen, allerdings bei pH-Werten von 3-4, 37°C Reaktionstemperatur und Reaktionszeiten bis zu 2o Stunden. Auch Labar und Sander (1976), die DMNA im Urin von Ratten nach Aminopyrin und Nitrit Gabe nachwiesen, schätzten die in vivo Nitrosierungsrate auf 3o%. Beim mikroskopischen Vergleich von Lebernekrosen nach toxischen Dosen von Aminopyrin und Nitrit kamen Lijinsky und Greenblatt (1972) zu ähnlichen Werten. Hosokawa und Miyamoto (1976) erhielten beim Betrachten von DNS-Strangbrüchen ein Äquivalent von 2 - 1o mg/kg DMNA für 4o mg/kg Aminopyrin und 8o mg/kg Nitrit. Taylor et al (1974) schließlich stellten fest, daß Tiere, die an 5 Tagen in der Woche 2o ml eines 1 ooo ppm A und N enthaltenen Gemisches erhielten und eine Ver-

gleichsgruppe, die 4o ppm DMNA erhielt, gleichzeitig verstarben. Dies entspräche einer molaren Ausbeute von ca. 12,5%.

Ein Großteil der Diskrepanzen mag auch darin seine Ursache haben, daß jeweils andere Erfolgskriterien betrachtet wurden. Auffällig ist jedoch, daß die geschätzte prozentuale Nitrosaminausbeute immer mehr abnimmt, je näher man an die Realität bzw. das Tier herangeht und biologische Reaktionen untersucht. Die Zahlen reichen von über 3o% bis ca. 4%, von der Betrachtung im Reagensglas über Strangbrüche der DNS und Ausmaß präneoplastischer Veränderungen bis zum Tumortod. Dazuhin zeigt sich beim Vergleich von in vivo Versuchen mit verschiedenen Aminopyrin und Nitrit Dosen, daß mit abnehmender Aminopyrin bzw. Nitrit Dosis auch die molare Ausbeute geringer wird. Die Größe der relativen DMNA Dosis beträgt bei ca.

1 ooo ppm Aminopyrin und Nitrit: 12 - 3o %
5oo ppm " " : 6 - 7 %
25o ppm " " : 3 %
1oo ppm " " : 1 %

Bei den beim Menschen zu erwartenden relativ niedrigen Aminopyrin Dosen ist also sicher nicht mit DMNA Ausbeuten von 3o % und mehr zu rechnen. Offen bleiben muß, warum in vivo dosisabhängig weniger DMNA zur Wirkung gelangt.

- Ob konzentrationsabhängig weniger Nitrosamin gebildet wird, oder ob entstehende niedrige DMNA Mengen
- zu einem geringeren Anteil am Wirkort anlangen. Dagegen sprechen die Befunde von Diaz Gomez et al (1977); oder

- ob bei geringeren DMNA Mengen in der Leber ein relativ größerer Dosisanteil metabolisch entgiftet wird.

Diese Annahme steht in Einklang mit in vitro und in vivo Analysen, die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurden.(Kunz et al 1978; Appel, Kunz 1978).
Obwohl bisher epidemiologische Studien zum Aminopyrin Verbrauch und der Carzinomhäufigkeit beim Menschen fehlen, scheint es durchaus berechtigt Aminopyrin als Analgetikum z.B. durch Novalgin^{R} (entsteht durch Einführen eines Methansulforestes in die Aminogruppe bei C 4 des Aminopyrin und kann somit, wie auch 4-Amino-Antipyrin kein DMNA mehr bilden) zu ersetzen. Ein weiterer Vorteil besteht in der viel kleineren Agranulocytosehäufigkeit.
Als Schutzmaßnahme vor der Nitrosierung anderer exogener und endogener Amine ist die Anwendung von Ascorbinsäure die optimale Präventivmaßnahme. Schon 1960 haben Dahn et al die Reaktion zwischen salpetriger Säure und Ascorbinsäure beschrieben, wobei über ein zuerst gebildetes Nitrosoascorbat schließlich Dehydroascorbinsäure und Stickstoffmonoxyd entsteht. Aufgrund dieses Befundes konnten Mirvish und Mitarbeiter (1972) in vitro zeigen, daß die Bildung von Nitrosaminen aus Nitrit und Aminen durch Zusatz von Vitamin C wesentlich reduziert oder sogar aufgehoben wird. Inzwischen wurde derselbe dosisabhängige Schutzeffekt auch für Aminopyrin und Nitrit bewiesen (Chan, Fong 1977; Fong, Chan 1976; Kamm et al 1973).

Allerdings mußte die Ascorbinsäurekonzentration 2 mal die molare Konzentration von Nitrit betragen, um einen 1oo %igen Schutz zu bieten. Vielleicht sollte Ascorbinsäure auch in gewißem Umfang routinemäßig stark nitrithaltigen Fleisch- und Wurstwaren zugesetzt werden. Fine et al (1977) konnten zeigen, daß durch Vitamin C ein DMNA Anstieg im menschlichen Blut nach einer Mahlzeit bestehend aus Schinken, Spinat, Tomaten und Bier bis auf nicht mehr nachweisbare Mengen unterdrückt wurde.

Der nächste Schritt, der zur Aufklärung der menschlichen Gefährdung durch aminopyrinhaltige Medikamente beitragen könnte, bestünde in der Suche nach einer Menschengruppe, die für eine epidemiologische Untersuchung geeignet erscheint. Beispielsweise könnten Patienten, die jahrelang Schmerzmittelabusus, vor allem mit aminophenazonhaltigen Mitteln betrieben haben, auf Präcanzerosen der Leber untersucht werden. Außerdem wäre eine ausführliche statistische Erhebung zur Anamnese krebskranker Patienten wünschenswert, die ihr Augenmerk besonders auf mögliche chemische Carzinogene richtet.

Obwohl die Gefahr, die von Aminopyrin ausging, nach dessen Verbot in der BRD gebannt erscheint, bedarf der eingangs erwähnte Nachweis, daß zahlreiche Medikamente nitrosiert werden können, einer genauen Analyse. Vor allem wurde auch für viele häufig und hoch dosiert eingenommene Medikamente, wie Librium^{R} (Preda et al 1976), Valium^{R}, Chlorpromazin, Piperazin und andere eine Nitrosierungsmöglich-

keit nachgewiesen; jedoch ist oft noch unklar, ob die entstehenden Nitrosoverbindungen auch carzinogen wirksam sind. Auch Novalgin^{R} kann z.B. nitrosiert werden, jedoch hat sich die entstehende Nitrosoverbindung bei Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe als nicht carzinogen erwiesen.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß durch Quantifizierung präneoplastischer Veränderungen die Möglichkeit gegeben ist, auch geringe Carzinogenmengen schon relativ früh nachzuweisen. Keinesfalls dürfen diese, wenn auch im Einzelfall geringen Nitrosaminmengen bagatellisiert werden, da durch die gleiche Organotropie gefährliche Summationswirkungen zustande kommen können.

4.2. Zum DMNA Schwellenwert Problem und der Frage der menschlichen Gefährdung durch Nitrosamine

Nitrosamine und vor allem DMNA kommen zwar nur in äußerst geringen Konzentrationen, dafür aber nahezu ubiquitär vor. Es gibt nur noch wenig Stellen, an denen nicht Nitrosamine gesucht und gefunden wurden. In der Luft (Bretschneider, Matz 1974) wurden Nitrosamingehalte von o,43 -o,oo1 ppb nachgewiesen; in einem afrikanischen Schnaps (McGlashan et al 1968) und in einer afrikanischen Solanaceenart, deren Saft zum Milchsäuern verwandt wird (Du Plessis et al 1969) fand man DMNA. In chinesischem Trockenfisch sogar in Konzentrationen von o,6 - 9,o ppm DMNA und 1,2 - 21,o

ppm DÄNA (Fong, Walsh 1971). Obwohl solche Konzentrationen sicher Ausnahmewerte darstellen, finden sich in Fleisch- und Wurstwaren häufiger Konzentrationen im ppb Bereich (Sen 1972; Preussmann 1975; IARC Monograph 1978). Sogar auf dem Mond konnten Simoneit und Burlingame (1971) aufgrund spektrographischer Untersuchungen wahrscheinlich machen, daß DMNA aus den Abgasen des Lunar Module produziert wurde als partielles Oxydationsprodukt des Raketentreibstoffs 1,1-Dimethyl-hydrazin.

Das Wort von der "Carzinogensuppe", in der wir alle schwimmen (Preussmann 1975), scheint nicht übertrieben.

Bisher wurden drei grundsätzliche Nitrosaminbildungsmöglichkeiten entdeckt:

- biologisch, in Pflanzen und durch Bakterien
- chemisch, durch Reaktion von sekundären Aminen mit Nitrosierungsmitteln
- durch die Maillard-Reaktion: Kondensation von Aldosen und Aminosäuren (Devik 1967).

Diese letztere Möglichkeit blieb allerdings nicht unwidersprochen. Heyns und Koch (1970) bezweifelten diese Bildungsmöglichkeit und zeigten, daß Devik wahrscheinlich Pyrazine und Acetylpyrrole, die Produkte dieser Reaktion sind, mit Nitrosaminen verwechselte.

Im Menschen können Nitrosamine nur in Hohlorganen entstehen, das heißt also im Magen-Darm-Kanal, der Harnblase (Hawksworth, Hill 1971) und eventuell der Vagina. Harington et al (1973) haben im Vaginalausfluß von

schwarzen Südafrikanerinnen DMNA nachgewiesen. Infektionen mit Trichomonaden, Monilien und E.coli könnten mitverantwortlich für diese Nitrosaminbildung sein. Die Rolle der Bakterien bei der Nitrosaminentstehung ist bis heute noch nicht ganz geklärt. Sie könnten zu der Nitrosaminbildung durch - Bildung sekundärer Amine

- Reduktion von Nitrat zu Nitrit
- enzymatische Katalyse der Nitrosierungsreaktion

beitragen. Hawksworth und Hill wiesen darauf hin, daß nicht so sehr der Dickdarm als Ort der bakteriellen Nitrosaminbildung Aufmerksamkeit verdient, wie Alam et al (1971 a und b; Klubes et al 1972; Hashimoto et al 1976) vorschlugen, da das Nitrat schon vom proximalen Dünndarm resorbiert wird und so gar nicht in den bakteriell besiedelten Dickdarm kommt, wo es zu Nitrit reduziert werden könnte, sondern die Blase. Das schnell resorbierte Nitrat kann dort bei Harnwegsinfektionen mit E.coli z.B. bakteriell reduziert werden und eine Nitrosierungsreaktion mit sekundären Aminen eingehen.
Andererseits können Darmbakterien DMNA auch zerstören (Rowland, Grasso 1975). Dagegen konnte Klubes nach 2o-stündiger Inkubation von DMNA mit Blinddarmbakterien noch 95% der ursprünglichen DMNA Menge wiedergewinnen. Zwangsläufig taucht somit die Frage nach einem Schwellenwert für Nitrosamine auf. Preussmann et al (1976) konnte einen solchen "no effect level" (d.h. eine Konzentration, bei der statistisch innerhalb der normalen Lebenszeit kein Tumoranstieg mehr nachweisbar war) für Nitrosopyr-

rolidin feststellen. Im Vergleich mit der von Terracini et al (1967) für DMNA und Druckrey et al (1963 b) für DÄNA ermittelten Daten ergeben sich folgende Werte:

Schwellenwerte bei	DMNA	1 - 2	mg/kg
oraler Verfütterung	DÄNA	1	Futter
an Ratten	Nitrosopyrrolidin	5	(= ppm)

Die vorliegenden Versuche, die von o,1 - o,oo1 mg/kg KG in ihren Dosierungen reichten, beginnen also ungefähr da, wo Terracini gerade noch einen Effekt feststellen konnte. Auch bei 2 ppm DMNA und 1o4 Wochen langer Fütterungsdauer mit einer Gesamtdosis von 22 mg fand sich noch ein Tier mit einem Lebertumor.

Können die oben stehenden Konzentrationen nach Reduzierung auf 1/1oo als unbedenklich für den Menschen betrachtet werden? Preussmann et al (1976) schlagen drei Extrapolationsmöglichkeiten für sehr niedrige Nitrosamindosen, die mit den herkömmlichen Tiermodellen nicht mehr untersucht werden können, vor.

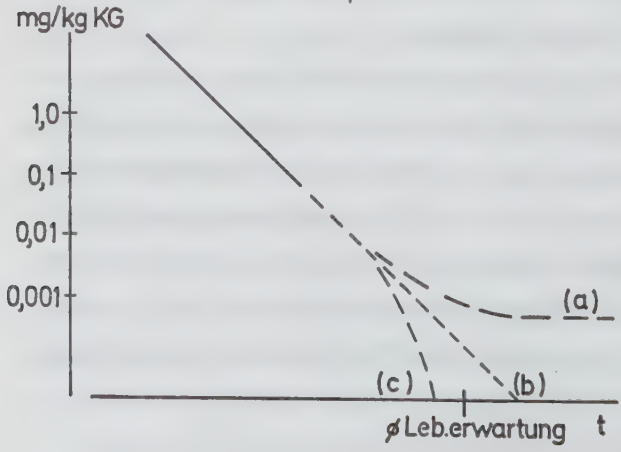


Abb. 11, modifiziert nach Preussmann et al (1976).

Würde (a) zutreffen, d.h. würde sich die Kurve asymptotisch der Zeitachse nähern, so bedeutete dies, daß es tatsächlich einen Schwellenwert gibt und das Risiko für den Menschen durch die Exposition gegenüber DMNA in diesen Mengen sehr gering ist. Bei (b) verläuft die Kurve auch in den sehr niedrigen Dosisbereichen weiter linear, das Risiko wäre auch hier noch verhältnismäßig niedrig. Trifft jedoch (c) zu, d.h. biegt die Kurve in den fraglichen Dosisbereichen zur Abszisse hin ab, so wären auch sehr niedrige Dosen für den Menschen gefährlich. Da es zur Zeit nicht möglich ist zu entscheiden, welche Kurve die richtige ist, sollte mit der quantitativen Ausmessung der Präcanzerosen versucht werden in diesen Bereich vorzustoßen. Daß dieser Versuch nicht die erwünschte Klarheit brachte, liegt wohl nicht zuletzt daran, daß der DMNA Gehalt im Futter, der inzwischen mehrfach nachgewiesen wurde, diese Dosisbereiche überdeckt. Kann et al (1977) untersuchten 46 kommerziell erhältliche Futtermittel für Versuchstiere auf flüchtige Nitrosamine. 8o% enthielten DMNA, der höchste gefundene Wert lag bei 79 ppb. Bei 59% ließ sich Nitrosopyrrolidin mit Maximalwerten von 26 ppb nachweisen. Drei Proben enthielten Spuren von DÄNA. Nach Preussmann (1975), der vor allem Fischmehl als Bestandteil von Tierfutter untersucht hatte, fanden sich sogar DMNA Konzentrationen bis zu o,4 ppm. Ähnliche Ergebnisse erhielten Juszkiewicz und Kowalski (1976) und Mirna et al (1976). Generell sollte bei der Untersuchung

niedriger Carzinogendosen zumindest eine laufende Kontrolle des Futternitrosamingehalts gewährleistet sein. Eine Wiederholung dieser Versuche mit nitrosaminfreiem Futter wäre wünschenswert.

Aus der Tatsache, daß DMNA durch Darmbakterien zerstört werden kann, und da es auch möglich erscheint, daß die Darmschleimhaut selbst geringe Nitrosaminmengen metabolisieren kann (Phillips et al 1975), stellt sich die Frage, ob sehr kleine Nitrosaminmengen, wie sie auch in menschlichen Nahrungsmitteln vorkommen, vor ihrer Resorption unschädlich gemacht werden. Aus diesen Gründen untersuchten Diaz Gomez et al (1977) die Resorption und den Metabolismus von DMNA in Dosierungen von 1o-o,oo1 mg/kg KG. DMNA wurde schnell resorbiert. Die Leber-DNS--Methylierung war proportional zu der verabreichten Dosis. Alles deutete darauf hin, daß auch geringste Dosen ohne Verlust resorbiert werden. Unter 4o µg/kg KG fand keine Methylierung von Nieren-DNS mehr statt. Dies erklärt auch die dosisabhängige Organotropie von DMNA: kurz und hoch dosiert führt es zu Nierentumoren (Magee, Barnes 1962), langdauernde und niedrige Dosierungen führten zu Lebertumoren (Magee, Barnes 1956). Da die Leber eine 4-5 fach höhere Metabolisierungskapazität als die Niere besitzt, werden kleine Dosen vollständig von ihr metabolisiert und gelangen also gar nicht erst in den großen Kreislauf. So verhindert die Leber, daß die Nitrosamine andere Organe

erreichen können. Außerdem scheint die Rattenleber für die Carzinogenität von einfachen Nitrosaminen weniger empfänglich zu sein als viele andere Organe dieses Tiers (Goth, Rajewsky 1974; Margison, Kleihues 1975), sodaß die bevorzugte Metabolisierung in der Leber sogar einen gewißen Schutzeffekt darstellte. Auch die Erholungsmöglichkeit von kleinen Carzinogendosen mußte in Betracht gezogen werden. Rajalakshmi und Sarma (1975) und Hosokawa und Miyamoto (1976) zeigten, daß sowohl DNS-Methylierungen, als auch DNS-Strangbrüche repariert werden können. Zunehmend wird auch die Möglichkeit einer metabolischen Inaktivierung von kleinen Nitrosaminmengen durch einen Reduktionsprozeß, an dem auch cyt. P-45o beteiligt ist, diskutiert (Appel et al 1979). In Übereinstimmung mit den Versuchen von Diaz Gomez zeigten auch die Untersuchungen der Präcanzerosen, wo selbst die unbehandelten Kontrolltiere Inseln aufwiesen, daß eine Erholungsmöglichkeit sicher nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Ein Vergleich mit den menschlichen Verhältnissen liegt nahe. Jede Leberschädigung führt zu einer verminderten Metabolisierungskapazität der Leber, außerdem wird durch die Zirrhose das Pfortaderblut durch extrahepatische Kollateralgefäße geleitet,und es bilden sich intrahepatische Shunts. All dies führt dazu, daß dann die Nitrosamine auch "sensiblere" Organe erreichen können.—

Dem Problem der Extrapolierbarkeit vom Tierversuch auf den Menschen kann man zur Zeit hauptsächlich nur mit ver-

gleichenden Stoffwechseluntersuchungen nahekommen. Läßt sich der Nachweis erbringen, daß der Stoffwechsel eines Carzinogens bei Versuchstier und Mensch identisch oder ähnlich ist (Montesano, Magee 197o; 1974; Harris et al 1977), so kann man mit größerer Sicherheit davon ausgehen, daß auch die biologischen Wirkungen beim Menschen gleich oder ähnlich sind. Bisher konnte kein Tier gefunden werden, das für die carzinogene Wirkung von Nitrosaminen nicht empfänglich ist; auch subhumane Primaten bekamen nach DÄNA Applikation ∝-Fetoprotein positive Lebercarzinome (Hull et al 1969).

Die Frage, ob die geringen Carzinogenmengen in der menschlichen Umwelt unterschwellig sind, d.h. innerhalb der normalen Lebenserwartung keine Tumoren mehr erzeugen, darf nicht nur unter dem Gesichtspunkt einer isolierten Betrachtung einzelner Carzinogene gesehen werden. Der Mensch ist heute einer Vielzahl von chemischen Carzinogenen ausgesetzt. Die große Anzahl verschiedener Carzinogene, die relativ geringen Mengen, die Wirkungen von Co-und Anticarzinogenese, sowie zahlreiche weitere Faktoren schaffen Bedingungen, die heute im Experiment kaum simuliert werden können. Die Umweltcarzinogenese stellt sich deshalb heute als ein Problem der Syncarzinogenese dar, sodaß wohl für das einzelne Carzinogen ein Schwellenwert im Tierversuch angegeben werden kann, nicht jedoch, wenn man den Mensch in seiner Umwelt betrachtet.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Zahlreiche Arzneimittel und Fremdstoffe mit sekundären und tertiären Aminogruppen bilden mit Nitrit im sauren Milieu des Magens Nitrosamine. Besonders ausgeprägt verläuft unter diesen Bedingungen die Nitrosierung von Aminopyrin, unter Bildung des hochcarzinogenen DMNA.
Als Beitrag zur Beurteilung einer möglichen humanpathologischen Bedeutung der endogenen Nitrosaminbildung sollte in der vorliegenden Arbeit am Beispiel der schnell ablaufenden Aminopyrinnitrosierung geprüft werden, ob diese Reaktion auch in niedrigen, praktisch relevanten Dosisbereichen einer menschlichen Exposition abläuft und ob die Bildung carzinogener Nitrosamine in gleichem Umfang erfolgt, wie bei den bislang geprüften unrealistisch hohen Dosierungen.
Dazu wurde weiblichen Wistarratten Aminopyrin und Nitrit in verschiedenen Konzentrationsbereichen von 500 bis 100 ppm einzeln und in Kombinationen mit dem Trinkwasser verabreicht. Als carzinogene Bezugssubstanz wurde DMNA in Konzentrationen von 8,3 bis 830 ppb in gleicher Weise verabfolgt. Zur Beurteilung der möglichen Bedeutung anderer Nitrosierungsprodukte erhielt ein weiteres Kollektiv 4-Amino-Antipyrin und Nitrit im Trinkwasser.
Zur quantitativen Beurteilung einer carzinogenen Wirksamkeit wurden Zahl und Ausmaß präneoplastischer ATPase Defekte mit morphometrischen Methoden bestimmt; bei Anwendung hoher Aminopyrin und Nitritdosen zusätzlich

canzeröse und toxische Leberveränderungen.

Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

1a Bei Applikation extrem hoher Aminopyrin und Nitritdosen traten ausschließlich toxische Wirkungen in Erscheinung. Die Tiere kamen innerhalb weniger Wochen ad exitum und zeigten bei der histologischen Untersuchung schwere toxische Leberveränderungen. Die in der Literatur unter diesen Versuchsbedingungen beschriebene Tumorbildung konnte nicht reproduziert werden.

1b Bei Zufuhr von 5oo ppm Aminopyrin und Nitrit verstarb die Hälfte der Tiere zwischen 1oo und 14o Tagen, vorwiegend durch Ruptur von Leberhämangioendotheliomen. Bei der Untersuchung des Restkollektivs zu diesem Zeitpunkt wurden bei allen Tieren neben sehr stark ausgeprägten präcanzerösen Gewebsveränderungen manifeste Lebertumoren, vorwiegend Hämangioendotheliome gefunden.

1c Bei Zufuhr von 25o ppm Aminopyrin und Nitrit waren nach 26o Tagen noch keine Lebertumoren nachweisbar. Alle Tiere zeigten jedoch schon nach 14o Tagen deutliche präneoplastische Enzymdefekte; Zahl und Fläche waren nach 26o Tagen weiter angestiegen. Bei Aufzeichnung im doppeltlogarithmischen Netz erfolgte der Anstieg der Inselfläche mit einer Steigung von 68^{o}, der der Inselzahl mit 61^{o}.

1d Bei der 1oo ppm Aminopyrin und Nitrit Gruppe lagen

zum Zeitpunkt der ersten Entnahme nach 14o Tagen Zahl und Größe präneoplastischer Veränderungen nur wenig über dem Wert der Kontrolltiere; auch hier fand sich bei der Entnahme nach 26o Tagen ein deutlicher Anstieg beider Größen. Die Zunahme von Inselzahl und Inselfläche erfolgte mit der gleichen Steigung wie bei der 25o ppm Aminopyrin und Nitrit Gruppe.

Bei chronischer Applikation von Aminopyrin und Nitrit verläuft der Anstieg von Zahl und Größe präneoplastischer Areale danach, wie schon für DÄNA nachgewiesen wurde, dosisunabhängig mit der gleichen Steigung.

1e Mit Hilfe des dosisunabhängigen mittleren Regressionskoeffizienten wurde für alle Dosen der Zeitpunkt des Erreichens einer definierten Inselfläche (1%) berechnet. Bei doppeltlog. Auftragung dieser Zeitpunkte gegen die dazu gehörige Dosis nach Druckrey wurde eine Regressionsgerade erhalten, auf der auch der 1oo ppm Aminopyrin und Nitrit Wert lag. Dadurch ist auszuschließen, daß die in diesen niederen, praktisch relevanten Dosisbereichen von Aminopyrin und Nitrit entstehenden DMNA Mengen einen möglichen Schwellenwert unterschreiten. Die mittlere Tumorinduktionszeit würde dabei rechnerisch allerdings etwa das 3-fache der mittleren Lebensdauer betragen.

2. Unbehandelte Kontrolltiere wiesen großenteils ebenfalls Enzymdefekte auf. Diese werden auf den nachgewiesenen Nitrosamingehalt des Futters zurückgeführt.

3a Isolierte Zufuhr von Aminopyrin führte auch in höchster Konzentration nicht zur Zunahme präneoplastischer Veränderungen; es fanden sich sogar zu beiden Zeitpunkten geringere Inselzahlen und Inselflächen als bei den Kontrolltieren. Als Ursache wird entweder die für andere Pharmaka schon beschriebene Induktion von nitrosamininaktivierenden Cytochrom P-450 Spezies, oder die kompetitive Verdrängung der Carzinogene von den aktivierenden Enzymkomplexen diskutiert.

3b Bei isolierter Zufuhr von Nitrit lagen die präneoplastischen Veränderungen alle im Streubereich der Kontrolltiere; nur bei der höchsten Konzentration von 1 000 ppm wurden gering, jedoch nicht signifikant erhöhte Werte gefunden.

4. 4-Amino-Antipyrin führte auch in höchster Konzentration von 500 ppm mit 500 ppm Nitrit zu keiner signifikanten Steigerung der Präneoplasien. Die carzinogene Wirksamkeit von Aminopyrin und Nitrit kann danach ausschließlich auf die endogene Entstehung von DMNA zurückgeführt werden.

5. DMNA führte nur in der höchsten angewandten Konzentration von 830 ppb entsprechend 0,1 mg/kg KG zu einer meßbaren Erhöhung von Zahl und Fläche der Inseln. Beim quantitativen Vergleich mit den bei Aminopyrin und Nitrit Applikation gefundenen präneoplastischen Veränderungen entsprach der Effekt von 0,1 mg/kg KG DMNA etwa dem von 200 ppm Aminopyrin und Nitrit.

6. Bezogen auf die maximal mögliche Bildung von 1 Mol DMNA pro Mol Aminopyrin, würde dies einer molaren Ausbeute von ca. 1,75% entsprechen. Analog durchgeführte Berechnungen zeigten, daß die DMNA Ausbeute unter in vivo Bedingungen sehr stark von der Konzentration der Reaktionspartner Aminopyrin und Nitrit abhängt. Sie beträgt bei: 1 ooo ppm etwa 12-3o%

5oo ppm " 6- 7%

25o ppm " 3%

1oo ppm " 1%.

Bei in vitro Analysen wurden demgegenüber konzentrationsunabhängige Ausbeuten von 5o% und mehr ermittelt. Es ist danach nicht möglich, zur Abschätzung des Umfangs der endogenen Nitrosaminbildung aus zu prüfenden Stoffen von in vitro Analysen auf die Verhältnisse in vivo zu schließen und von hohen Konzentrationen auf niedrige zu extrapolieren.

6. TABELLARISCHER ANHANG

Jeder Meßwert der histochemischen Untersuchungen wurde aus 5 in verschiedenen Schnittebenen (Abstand 400 µm) derselben Leber gemessenen Werten gemittelt.

Tabelle 1: Erster Auswertungstermin nach 14o Tagen. Durchfütterung folgender Kombinationen und Dosierungen. (Konzentrationsangaben in ppm, sofern nicht anders erwähnt) Die Tiere kamen 3-7 Tage nach der letzten Wirkstoffapplikation zur Schlachtung.

Tier	IZ/cm^2	% Inselgewebe
5oo A und N (1)	28,o5	1,82
5oo A und N (2)	18,93	o,6o6
5oo A und N (3)	27,38	1,52
5oo A und N (4)	4o,56	1,896
Mittelwert:	28,73	1,46o5
25o A und N (1)	1,97	o,o369
25o A und N (2)	3,56	o,o817
25o A und N (3)	o,78	o,oo82
25o A und N (4)	7,92	o,1984
Mittelwert:	3,56	o,o813
1oo A und N (1)	o,21	o,oo49
1oo A und N (2)	o	o
1oo A und N (3)	o	o
1oo A und N (4)	o,77	o,oo43
1oo A und N (5)	3,16	o,o318
Mittelwert:	o,83	o,oo82

Tier	IZ/cm^2	% Inselgewebe
500 A (1)	1,25	0,0162
500 A (2)	0	0
500 A (3)	0	0
500 A (4)	0	0
500 A (5)	0	0
Mittelwert:	0,25	0,0032
1 000 N (1)	0,86	0,0086
1 000 N (2)	0,48	0,0028
1 000 N (3)	1,14	0,0090
1 000 N (4)	0	0
1 000 N (5)	0,23	0,0028
Mittelwert:	0,54	0,0046
500 N (1)	0	0
500 N (2)	0	0
500 N (3)	1,81	0,0197
500 N (4)	0,86	0,0105
500 N (5)	1,09	0,0103
Mittelwert:	0,75	0,0081
Kontrolle (1)	0	0
Kontrolle (2)	0	0
Kontrolle (3)	5,87	0,0513
Kontrolle (4)	0	0
Kontrolle (5)	0	0
Mittelwert:	1,17	0,0103

Tabelle 2: Zweiter Auswertungstermin nach 26o Tagen. Durchfütterung folgender Kombinationen und Dosierungen. (Konzentrationsangaben in ppm, sofern nicht anders erwähnt) Die Tiere kamen 3-7 Tage nach der letzten Wirkstoffapplikation zur Schlachtung.

Tier	IZ/cm^2	% Inselgewebe
25o A und N (1)	12,6o	o,2261
25o A und N (2)	12,44	o,5695
25o A und N (3)	3,94	o,2431
25o A und N (4)	5,71	o,1182
25o A und N (5)	7,59	o,3457
Mittelwert:	8,46	o,3oo5
1oo A und N (1)	o	o
1oo A und N (2)	3,61	o,o573
1oo A und N (3)	o,42	o,oo6o
1oo A und N (4)	1,99	o,o117
1oo A und N (5)	o	o
Mittelwert:	1,2o	o,o15o
5oo A (1)	o	o
5oo A (2)	o	o
5oo A (3)	o	o
5oo A (4)	o	o
5oo A (5)	o,33	o,o176
Mittelwert:	o,o7	o,oo35

Tier	IZ/cm^2	% Inselgewebe
1 ooo N (1)	1,95	o,o25o
1 ooo N (2)	o	o
1 ooo N (3)	o,22	o,oo52
1 ooo N (4)	o,38	o,o125
1 ooo N (5)	o,19	o,oo45
Mittelwert:	o,55	o,oo94
5oo N (1)	o	o
5oo N (2)	o	o
5oo N (3)	o,16	o,o121
5oo N (4)	o,96	o,oo49
5oo N (5)	o,75	o,o2oo
Mittelwert:	o,37	o,oo74
Kontrolle (1)	o	o
Kontrolle (2)	o,48	o,oo93
Kontrolle (3)	o	o
Kontrolle (4)	o,22	o,oo13
Kontrolle (5)	o	o
Kontrolle (6)	o,95	o,oo84
Kontrolle (7)	o,91	o,oo68
Kontrolle (8)	o,22	o,oo53
Mittelwert:	o,35	o,oo39

Tabelle 3: Auswertung nach 15o Tagen Durchfütterung folgender Konzentrationen und Dosierungen von 4-Amino-Antipyrin und Nitrit. (Angaben in ppm)

Tier	IZ/cm^2	% Inselgewebe
An und N 5oo (1)	o	o
An und N 5oo (2)	o,42	o,oo74
An und N 5oo (3)	3,9o	o,o286
An und N 5oo (4)	1,oo	o,o17o
An und N 5oo (5)	3,82	o,363o
Mittelwert:	1,83	o,o832
An und N 125 (1)	1,69	o,oo71
An und N 125 (2)	o,68	o,oo79
An und N 125 (3)	o,73	o,o1o8
An und N 125 (4)	2,75	o,oo91
An und N 125 (5)	1,44	o,oo97
Mittelwert:	1,46	o,oo89
An 1 ooo (1)	1,93	o,o768
An 1 ooo (2)	3,o3	o,o128
An 1 ooo (3)	o,44	o,o231
An 1 ooo (4)	1,98	o,oo89
Mittelwert:	1,85	o,o3o4

Tabelle 4: Auswertung nach 15o Tagen Durchfütterung von

o,1 mg/kg KG DMNA

o,o1 mg/kg KG DMNA

o,oo1 mg/kg KG DMNA

Tier	IZ/cm^2	% Inselgewebe
DMNA o,1 (1)	2,71	o,o517
DMNA o,1 (2)	4,79	o,o652
DMNA o,1 (3)	4,32	o,o662
DMNA o,1 (4)	3,12	o,o542
DMNA o,1 (5)	o	o
Mittelwert:	2,99	o,o475
DMNA o,o1 (1)	o,33	o,o193
DMNA o,o1 (2)	3,31	o,o249
DMNA o,o1 (3)	o,61	o,o181
DMNA o,o1 (4)	o	o
DMNA o,o1 (5)	1,38	o,o162
Mittelwert:	1,13	o,o157
DMNA o,oo1 (1)	5,54	o,o592
DMNA o,oo1 (2)	4,29	o,o722
DMNA o,oo1 (3)	o	o
DMNA o,oo1 (4)	1,56	o,o185
DMNA o,oo1 (5)	2,o1	o,o34o
Mittelwert:	2,68	o,o368

Tabelle 5: Kontrolltiere, die nach 15o Tagen zur Auswertung kamen.

Tier	IZ/cm^2	% Inselgewebe
Kontrolle (1)	3,19	o,o347
Kontrolle (2)	3,o1	o,o747
Kontrolle (3)	2,4	o,o529
Kontrolle (4)	o	o
Kontrolle (5)	o	o
Kontrolle (6)	o	o
Kontrolle (7)	o	o
Kontrolle (8)	1,5	o,o341
Kontrolle (9)	3,38	o,o6oo
Kontrolle (1o)	o	o
Kontrolle (11)	2,o8	o,o529
Kontrolle (12)	o	o
Kontrolle (13)	3,16	o,o347
Mittelwert:	1,44	o,o265

7. LITERATURVERZEICHNIS

(a) ALAM,B.S.; SAPOROSCHETZ,I.B.; EPSTEIN,S.S.: Formation of N-Nitrosopiperidine from piperidine and sodium nitrite in the stomach and the isolated intestinal loop of the rat.
Nature 232, 116-118 (1971).

(b) ALAM,B.S.; SAPOROSCHETZ,I.B.; EPSTEIN,S.S.: Synthesis of nitrosopiperidine from nitrate and piperidine in the gastrointestinal tract of the rat.
Nature 232, 199-2oo (1971).

APPEL,K.E.: Bedeutung der Cytochrom P-45o Funktion für Metabolismus, Alkylierungsintensität und carzinogene Wirksamkeit von DMNA.
Dissertation Tübingen 1976.

APPEL,K.E.; KUNZ,W.: Differences in binding of nitrosamines to cyt. P-45o. Possible relevance for their activation and inactivation.
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 3o2, R 2o (1978).

APPEL,K.E.; KUNZ,W.; SCHWARZ,M.; STÖCKLE,G.: Metabolism, alkylating intensity and carcinogenicity of dialkylnitrosamines by modified cyt.P-45o function.
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 293, R 65 (1976).

APPEL,K.E.; RICKART,R.; SCHWARZ,M.; KUNZ,H.W.: Influence of drugs on activation and inactivation of hepatocarcinogenic nitrosamines.
Arch Toxicol, Suppl. 2, 471-477 (1979).

ARCOS,J.C.; DAVIS,D.L.; BROWN,C.E.L.; ARGUS,M.S.: Repressible and inducible enzymic forms of DMNA--demethylase.
Z Krebsforsch 89, 181-199 (1977).

ASAHINA,S.; FRIEDMANN,M.A.; ARNOLD,E.; MILLAR,G.N.; MISHKIN,M.; BISHOP,Y.; EPSTEIN,S.S.: Acute synergistic toxicity and hepatic necrosis following oral administration of sodium nitrite and secondary amines to mice.
Cancer Res 31, 1201-1205 (1971).

AYANABA,A.; ALEXANDER,M.: Microbial formation of nitrosamines in vitro.
Appl Microbiol 25, 862-868 (1973).

BAUMELER,H.R.; DUBACH,U.C.: Zur Epidemiologie der Aminophenazonausscheidung im Urin.
Schweiz Med Wochenschr 101, 328-334 (1971).

BARNES,J.M.; MAGEE,P.N.: Some toxic properties of DMNA.
Brit J Industr Med 11, 167 (1954).

BEYERMANN,K.: Chemie für Mediziner.
Stuttgart: Thieme 1971.

BOCKMÜHL,M.: Oxidative cleavage in the antipyrine series.
Med Chem Abh Med Chem Forsch Farbenind 3, 294-309 (1936).

BOYLAND,E.; WALKER,S.A.: Catalysis of the reaction of aminopyrine and nitrite by thiocyanate. Arzneim Forsch 24, 1181-1184 (1974).

BRETSCHNEIDER,K.; MATZ,J.: Nitrosamine in der atmosphärischen und in der Luft am Arbeitsplatz. Arch Geschwulstforsch 43, 36-41 (1974).

BRODIE,B.B.; AXELROD,J.: The fate of aminopyrine in man and methods for the estimation of aminopyrine and its metabolites in biological material. J Pharmacol Exp Ther 98, 171-184 (1950).

CHAN,W.C.; FONG,Y.Y.: Ascorbic acid prevents liver tumour production by aminopyrine and nitrite in the rat. Int J Cancer 20, 268-270 (1977).

CUELLO,C.; CORREA,P.; HAENSZEL,W.: Gastric cancer in Colombia. I. Cancer risk and suspect environmental agents. J Nat Cancer Inst 57, 1015-1020 (1976).

CZYGAN,P.; GREIM,H.; GARRO,A.J.; HUTTERER,F.; SCHAFFNER,F.; POPPER,H.; ROSENTHAL,O.; COOPER,D.Y.: Microsomal metabolism of DMNA and the cyt.P-450 dependency of its activation to a mutagen. Cancer Res 33, 2983-2986 (1973).

DAHN,H.; LOEWE,L.; BUNTON,C.A.: Über die Oxydation von Ascorbinsäure durch salpetrige Säure. VI. Übersicht und Diskussion der Ergebnisse. Helv Chim Acta 43, 320-333 (1960).

DEVIK,O.G.: Formation of N-Nitrosamines by the Maillard reaction.
Acta Chem Scand (B) 21, 2302-2303 (1967).

DIAZ GOMEZ,M.I.; SWANN,P.F.;MAGEE,P.N.: The absorption and metabolism in rats of small oral doses of DMNA.
Biochem J 164, 497-500 (1977).

DRUCKREY,H.; PREUSSMANN,R.; SCHMÄHL,D.; MÜLLER,M.: Chemische Konstitution und carzinogene Wirkung bei Nitrosaminen.
Naturwissenschaften 5, 134-135 (1961).

DRUCKREY,H.; SCHMÄHL,D.; DISCHLER,W.; SCHILDBACH,A.: Quantitative Analyse der experimentellen Krebserzeugung.
Naturwissenschaften 10, 217-228 (1962).

(a) DRUCKREY,H.; STEINHOFF,H.; BEUTHNER,H.; SCHNEIDER,H.; KLÄRNER,P.: Prüfung von Nitrit auf chronisch toxische Wirkung an Ratten.
Arzneim Forsch 13, 320-323 (1963).

(b) DRUCKREY,H.; SCHILDBACH,A.; SCHMÄHL,D.; PREUSSMANN,R.; IVANKOVIC,S.: Quantitative Analyse der carzinogenen Wirkung von DÄNA.
Arzneim Forsch 13, 841-851 (1963).

DRUCKREY,H.; PREUSSMANN,R.; IVANKOVIC,S.; SCHMÄHL,D.: Organotrope carzinogene Wirkungen bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an BD-Ratten.
Z Krebsforsch 69, 103-201 (1967).

DU PLESSIS,L.S.; NUNN,J.R.; ROACH,W.A.: Carcinogen in a Transkeian Bantu food additive.
Nature 222, 1198-1199 (1969).

EISENBRAND,G.; SPIEGELHALDER,B.; JANZOWSKI,C.; KANN,J.; PREUSSMANN,R.: Volatile and non-volatile N-nitroso compounds in foods and other environmental media.
IARC Sci Publications 19, (in press) (1978).

EMMELOT,P.; SCHERER,E.: Multi-hit kinetics of tumor formation, with special reference to experimental liver and human lung carcinogenesis and some general conclusions.
Cancer Res 37, 17o2-17o8 (1977).

EPSTEIN,S.S.: Vortrag anläßlich des Joint Meeting on the analysis and formation of nitrosamines in Heidelberg , Oktober 1971.

FALK,H.L.: Possible mechanism of combination effects in chemical carcinogenesis.
Oncology 33, 77-85 (1976).

FINE,D.H.; ROSS,R.; ROUNBEHLER,D.P.; SIVERGLEID,A.; SONG,L.: Formation in vivo of volatile N-nitrosamines in man after ingestion of cooked bacon and spinach.
Nature 265, 753-755 (1977).

FONG,Y.Y.; WALSH,F.O.F.: Carcinogenic nitrosamines in cantonese salt-dried fish.
Lancet 1971 II, 1o32.

FONG,Y.Y.; CHAN,W.C.: Effect of ascorbate on amine-nitrite carcinogenicity.
IARC Sci Publications 14, 461-464 (1976).

FREUND,H.A.: Clinical manifestations and studies in parenchymatous hepatitis.
Ann Intern Med 1o, 1144-1155 (1937).

FRIEDMANN,M.A.; GREENE,E.J.; EPSTEIN,S.S.: Rapid gastic adsorption of sodium nitrite in mice.
J Pharm Sci 61, 1492-1494 (1972).

FRIEDRICH-FREKSA,H.; GÖSSNER,W.; BÖRNER,P.: Histochemische Untersuchungen der Canzerogenese in der Rattenleber nach Dauergaben von DÄNA.
Z Krebsforsch 72, 226-239 (1969).

FRIEDRICH-FREKSA,H.; PAPADOPULU,G.; GÖSSNER,W.: Histochemische Untersuchungen in der Rattenleber nach zeitlich begrenzter Verabfolgung von DÄNA.
Z Krebsforsch 72, 24o-253 (1969).

FRIEDRICH-FREKSA,H.; HOFFMANN,M.: Immunological defence against preneoplastic stages of DENA induced carcinomas in rat liver.
Nature 223, 1162-1163 (1969).

GÖSSNER,W.; FRIEDRICH-FREKSA,H.: Histochemische Untersuchungen über die Gluc-6-Phosphatase in der Rattenleber während der Canzerisierung durch Nitrosamine.
Z Naturforsch 19 b, 862-863 (1964).

GOODMAN,L.S.; GILMAN,A.: The pharmacological basis of therapeutics. 5. Auflage New York: Mac Millan Publishing Co 1975, 347-348.

GOTH,R.; RAJEWSKY,M.F.: Persistance of O-6-ethylguanine in rat brain DNA: correlation with nervous system specific carcinogenesis by ethylnitrosourea. Proc Natl Acad Sci USA 71, 639-643 (1974).

GREENBLATT,M.: Ascorbic acid blocking of aminopyrine nitrosation in NZO/BI mice. J Nat Cancer Inst 5o, 1o55-1o56 (1973).

HADJIOLOW,D.; MARKOW,D.: Fine structure of hemangio-endothelial sarcomas in the rat liver induced with N-Nitrosodimethylamine. Arch Geschwulstforsch 42, 12o-126 (1973).

HARINGTON,J.S.; NUNN, J.R.; IRWIG,L.: DMNA in the human vaginal vault. Nature 241, 49-5o (1973).

HARRIS,C.C.; ANTRUP,H.; STONER,G.D.; MC DOWELL,E.M.; TRUMP,B.F.; SCHAFER,P.: Metabolism of DMNA and 1,2-dimethylhydrazine in cultured human bronchi. Cancer Res 37, 23o9-2311 (1977).

HASHIMOTO,S.; YOKOKURA,T.; KAWAI,Y.; MUTAI,M.: DMNA formation in the gastrointestinal tract of rats. Food Cosmet Toxicol 14, 553-556 (1976).

HAWKSWORTH,G.M.;HILL,M.J.: Bacteria and the N-nitrosation of secondary amines. Br J Cancer 25, 52o-526 (1971).

HEADING,C.E.; PHILLIPS,J.C.; LAKE,B.G.; GANGOLLI,S.D.; LLOYD,A.G.: Some aspects of the metabolism of DMNA in the rat.
Biochem Soc Trans 2, 607-610 (1974).

HEIN,G.E.: The reaction of tertiary amines with nitrous acid.
J Chem Educ 40, 181-184 (1963).

HEYNS,K.; KOCH,H.: Zur Frage der Entstehung von Nitrosaminen bei der Reaktion von Monosachariden mit Aminosäuren (Maillard Reaktion).
Tetrahedron Lett 10, 741-744 (1970).

HOSOKAWA,S.; MIYAMOTO,J.: Damage and repair of rat liver DNA by simultaneous oral administration of amines and nitrite.
Gann (Tokyo) 67, 819-823 (1976).

HUGULEY,C.M.jr.: Agranulocytosis induced by dipyrone, a hazardous antipyretic and analgesic.
J Am Med Ass 189, 938 (1964).

HULL,E.W.; CARBONE,P.P.; GITLIN,D.; O'GARA,R.W.; KELLY,M.G.: α-fetoprotein in monkeys with hepatoma.
J Natl Cancer Inst 42, 1035-1044 (1969).

IARC Monographs: On the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some N-nitroso compounds.
Vol. 17, 125-175 (1978).

ISSENBERG,P.: Nitrite, nitrosamines and cancer.
Fed Proc 35, 1322-1326 (1976).

JUSZKIEWICZ,T.;KOWALSKI,B.: An investigation of the possible presence or formation of nitrosamines in animal feeds.
IARC Sci Publications14, 375-383 (1976).

KAMM,J.J.; DASHMAN,T.; CONNEY,A.H.; BURNS,J.J.: Protective effects of ascorbic acid on hepatotoxicity caused by sodium nitrite plus aminopyrine.
Proc Natl Acad Sci USA 7o, 747-749 (1973).

KANN,J.; SPIEGELHALDER,B.; EISENBRAND,G.; PREUSSMANN,R.: Occurence of volatile N-nitrosamines in animal diets.
Z Krebsforsch 9o, 321-323 (1977).

KLUBES,P.; CERNA,I.; RABINOWITZ,A.D.; JONDORF,W.R.: Factors affecting DMNA formation from simple precursors by rat intestinal bacteria.
Food Cosmet Toxicol 1o, 757-767 (1972).

KNECHT,M.: Verteilung und Verweilzeit von DMNA im Organismus der Ratte.
Z Krebsforsch 69, 293-296 (1967).

KOLLER,S.: Neue graphische Daten zur Beurteilung statistischer Zahlen, 4. Auflage Darmstadt: Dr. Dietrich Steinkopff Verlag 1969.

KUNZ,W.; SCHAUDE,G.; THOMAS,C.: Die Beeinflussung der Nitrosamincarzinogenese durch Phenobarbital und Halogenkohlenwasserstoffe.
Z Krebsforsch 72, 291-3o4 (1969).

KUNZ,W.; STÖCKLE,G.; APPEL,K.: Quantitative analyses of enzyme-deficient cell areas to assess early precancerous alterations of hepatocarcinogenic substances.
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 293, R 65 (1976).

KUNZ,W.; APPEL,K.E.; RICKART,R.; SCHWARZ,M.; STÖCKLE,G.: Enhancement and inhibition of carcinogenic effectiveness of nitrosamines.
in: Primary Liver Tumors. Edts.: Remmer,H.; Bolt,H.M.; Bannasch,P.; Popper, H. MTP Press LTD. Lancaster 1978.

LABAR,J.; SANDER,J.: Carcinogenic N-nitroso-dimethylamine from the reaction of the analgesic amidopyrine and nitrite extracted from foodstuffs.
Z Krebsforsch 84, 299-310 (1975).

LABAR,J.; SANDER,J.: Experiments on the detection of the carcinogenic N-nitroso-dimethylamine in the urine of rats after oral administration of the analgesic amidopyrine and nitrite.
Arzneimittelforsch 26, 1340-1342 (1976).

LANE,R.P.; BAILEY,M.E.: The effect of pH on DMNA formation in human gastric juice.
Food Cosmet Toxicol 11, 851-854 (1973).

LIJINSKY,W.: Reaction of drugs with nitrous acid as a source of carcinogenic nitrosamines.
Cancer Res 34, 255-258 (1974).

LIJINSKY,W.; GREENBLATT,M.: Carcinogen dimethylnitrosamine produced in vivo from nitrite and aminopyrine.
Nature 236, 177-178 (1972).

LIJINSKY,W.; CONRAD,E.;VAN DE BOGART,R.: Carcinogenic nitrosamines formed by drug/nitrite interactions. Nature 239, 165-167 (1972).

(a) LIJINSKY,W.; KEEFER,L.; CONRAD,E.; VAN DE BOGART,R.: Nitrosation of tertiary amines and some biologic implications.
J Natl Cancer Inst 49, 1239-1249 (1972).

LIJINSKY,W.; TAYLOR,H.W.; SNYDER,C.; NETTESHEIM,P.: Malignant tumours of liver and lung in rats fed aminopyrine or heptamethyleneimine together with nitrite.
Nature 244, 176-178 (1973).

MAGEE,P.N.; BARNES,J.M.: The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine.
Br J Cancer 10, 114-122 (1956).

MAGEE,P.N.; BARNES,J.M.: Induction of kidney tumours in the rat with dimethylnitrosamine.
J Pathol Bact 84, 19-31 (1962).

MAGEE,P.N.; BARNES,J.M.: Carcinogenic nitroso compounds.
Adv Cancer Res 10, 163-246 (1967).

MARGISON,G.P.; KLEIHUES,P.: Chemical carcinogenesis in the nervous system. Preferential accumulation of O-6-methylguanine in rat brain DNA during repetitive administration of N-methyl-nitrosourea.
Biochem J 148, 521-525 (1975).

MARQUARDT,H.; RUFINO,F.; WEISBURGER,J.H.: On the aetiology of gastric cancer; mutagenicity of food extracts after incubation with nitrite.
Food Cosmet Toxicol 15, 97-1oo (1977).

MCGLASHAN,N.D.; WALTERS,C.L.; MCLEAN,A.E.M.: Nitrosamines in african alcoholic spirits and oesophagal cancer.
Lancet 1968 II, 1o17

MILLS,A.L.; ALEXANDER,M.: N-nitrosamine formation by cultures of several microorganisms.
Appl Environ Microbiol 31, 892-895 (1976).

MIRNA,A.; HARADA,K.; RAPP,U.; KAUFMANN,H.: N-Nitrosamine in Futtermitteln.
Fleischwirtschaft 7, 1o14 (1976).

MIRVISH,S.S.: Formation of N-nitroso compounds: chemistry, kinetics and in vivo occurence.
Toxicol Appl Pharmacol 31, 325-351 (1975).

MIRVISH,S.S.: Blocking the formation of N-nitroso compounds with ascorbic acid in vitro and in vivo.
Ann NY Acad Sci 258, 175-18o (1975).

MIRVISH,S.S.; WALLCAVE,L.; EAGEN,M.; SHUBIK,P.: Ascorbate-nitrite reaction: possible means of blocking the formation of carcinogenic N-nitroso compounds.
Science 177, 65-68 (1972).

MIRVISH,S.S.; GOLD,B.; EAGEN,M.; ARNOLD,S.: Kinetics of the nitrosation of aminopyrine to give DMNA.
Z Krebsforsch 82, 259-268 (1974).

MONTESANO,R.; MAGEE,P.N.: Metabolism of DMNA by human liver slices in vitro.
Nature 228, 173-174 (1970).

MONTESANO,R.; MAGEE,P.N.: Comparative metabolism in vitro of nitrosamines in various animal species including man.
IARC Sci Publications 1o, 39-56 (1974).

PALVA,I.P.; MUSTALA,O.O.: Drug-induced agranulocytosis with special reference to aminophenazone.
Acta Med Scand 187, 1o9-115 (197o).

PAPADOPULU,G.: Histochemische Untersuchungen an der Rattenleber nach Verabfolgung von Nitrosaminen.
Dissertation Tübingen 1967.

PHILLIPS,J.C.; LAKE,B.G.; HEADING,C.E.; GANGOLLI,S.D.; LLOYD,A.G.: Studies on the metabolism of DMNA in the rat. I. Effect of dose, route of administration and sex.
Food Cosmet Toxicol 13, 2o3-2o9 (1975).

PIRSCHEL,J.: Quantitative Untersuchungen über den irreversiblen Verlust 2er Enzymaktivitäten in der Rattenleber während der Canzerogenese mit DÄNA.
Dissertation Tübingen 1972.

POPLAWSKI,S.; UEHLECKE,H.: Metabolic activation and irreversible protein binding of 3-14C-antipyrine in vivo and in vitro.
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 293, R 5o (1976).

PRATT,O.E.: Some factors affecting rat brain phosphatase activity in fresh tissue suspensions and in histochemical methods.
Biochim Biophys Acta 14, 380-389 (1954).

PREDA,N.; POPA,L.; GALES,V.; SIMU,G.: N-nitroso compound formation by chlordiazepoxide and nitrite interaction in vitro and in vivo: protective action of ascorbic acid.
IARC Sci Publications 14, 301-304 (1976).

PREUSSMANN,R.: Chemische Carzinogene in der menschlichen Umwelt. In Handbuch der allgemeinen Pathologie. New York/Heidelberg/Berlin Springer 1975. Band VI/2,Teil 2, 421-594.

(a) PREUSMANN,R.; EISENBRAND,G.; SCHMÄHL,D.: Carcinogenicity testing of low doses of nitrosopyrrolidine and of nitrosobenzthiazuron and nitrosocarbaryl in rats.
IARC Sci Publications 14, 429-433 (1976).

PREUSSMANN,R.; SCHMÄHL,D.; EISENBRAND,G.; PORT,R.: Dose-response study with N-nitrosopyrrolidine and some comments on risk evaluation of environmental N-nitroso compounds.
Proc 2nd Int Symp Nitrite Meat Prod.Zeist 1976. Pudoc, Wageningen 261-268.

RABES,H.M.; SCHOLZE,P.; JANTSCH,B.: Growth kinetics of DENA-induced, enzymedeficient preneoplastic liver cell populations in vivo and in vitro.
Cancer Res 32, 2577-2586 (1972).

RAJALAKSHMI,S.;SARMA,D.S.R.: Replication of hepatic DNA in rats treated with DMNA.
Chem Biol Interact 11, 245-252 (1975).

REINERI,R.; WEISBURGER,J.H.: Reduction of gastric carcinogens with ascorbic acid.
Ann NY Acad Sci 258, 181-189 (1975).

REMMER,H.; MERKER,H.J.: Effect of drugs on the formation of smooth endoplasmatic reticulum and drug-metabolizing enzymes.
Ann NY Acad Sci 123, 79 (1965).

ROWLAND,I.R.; GRASSO,P.: Degradation of N-nitrosamines by intestinal bacteria.
Appl Microbiol 29, 7-12 (1975).

RUDELL,W.S.J.; BONE,E.S.; Hill,N.J.: Gastric juice nitrite. A risk factor for cancer in the hypochloric stomach?
Lancet 1976 II, 1037-1039

SADUSK,J.F.: The relationship of the food and drug administration to the practice of medicine and the aminopyrine-dipyrone problem.
J New Drugs 5, 57-62 (1965).

SANDER,J.: Kann Nitrit in der menschlichen Nahrung Ursache einer Krebsentstehung durch Nitrosaminbildung sein?
Arch Hyg 151, 22-28 (1967).

SANDER,J.: Nitrosaminsynthese durch Bakterien.
Hoppe Seylers Z Physiol Chem 349, 429-432 (1968).

SANDER,J.: Untersuchungen über die Entstehung canzerogener Nitrosoverbindungen im Magen von Versuchstieren und ihre Bedeutung für den Menschen.
I. Arzneim Forsch 21, 1572-158o (1971).
II. Arzneim Forsch 21, 17o7-1713 (1971).
III. Arzneim Forsch 21, 2o34-2o39 (1971).

SANDER,J.; BÜRKLE,G.: Induktion maligner Tumoren bei Ratten durch gleichzeitige Verfütterung von Nitrit und sekundären Aminen.
Z Krebsforsch 73, 54-66 (1969).

SANDER,J.; SCHWEINSBERG,F.: Wechselbeziehungen zwischen Nitrat, Nitrit und canzerogenen N-Nitrosoverbindungen. 1. und 2. Mitteilung.
Zbl Bakt Hyg I.Abt., Orig B 156, 299-34o (1972).

SANDER,J.; SEIF,F.: Bakterielle Reduktion von Nitrat im Magen des Menschen als Ursache einer Nitrosaminbildung.
Arzneim Forsch 19, 1o91 (1969).

SANDER,J.; SCHWEINSBERG,F.; MENZ,H.P.: Untersuchungen über die Entstehung canzerogener Nitrosamine im Magen.
Hoppe Seylers Z Physiol Chem 349, 1691-1697 (1968).

SANDER,J.; LABAR,J.; LADENSTEIN,M.; SCHWEINSBERG,F.: Quantitative measurement of in vivo nitrosamine formation.
IARC Sci Publications 9, 123-131 (1974).

SANDER,J.; SCHWEINSBERG,F.; LADENSTEIN,M.; BENZING,H.; WAHL,S.H.: Messung der renalen Nitrosaminausscheidung am Hund zum Nachweis einer Nitrosaminbildung in vivo.
Hoppe Seylers Z Physiol Chem 354, 384-390 (1973).

SEN,N.P.: The evidence for the presence of DMNA in meat products.
Food Cosmet Toxicol 10, 219-223 (1972).

SEN,N.P.: N-nitrosamines: occurence, formation and analysis. In: Toxic constituents of animal foodstuffs. New York/London, Academic Press 1974.

SIMONEIT,B.R.; BURLINGAME,A.L.: Organic analyses of selected areas of surveyor III recovered on the Apollo 12 mission.
Nature 234, 210-211 (1971).

SMITH,P.A.; LOEPPKY,R.N.: Nitrosative cleavage of tertiary amines.
J Am Chem Soc 89, 1147-1157 (1967).

SWANN,P.F.; MAGEE,P.N.; MOHR,U.; REZNIK,G.; GREEN,U.; KAUFMAN,D.G.: Possible repair of carcinogenic damage caused by DMNA in rat kidney.
Nature 263, 134-136 (1976).

SCHAUER,A.; KUNZE,E.: Enzymhistochemische und autoradiographische Untersuchungen der Canzerisierung der Rattenleber mit DÄNA.
Z Krebsforsch 70, 252-266 (1968).

SCHERER,E.; HOFFMANN,M.: Probable clonal genesis of cellular islands induced in the rat liver by DENA. Eur J Cancer 7, 369-371 (1971).

SCHERER,E.; EMMELOT,P.: Kinetics of induction and growth of enzyme-deficient islands involved in hepatocarcinogenesis. Cancer Res 36, 2544-2554 (1976).

SCHIEFERSTEIN,G.; PIRSCHEL,J.; FRANK,W.; FRIEDRICH-FREKSA,H.: Quantitative Untersuchungen über den irreversiblen Verlust zweier Enzymaktivitäten in der Rattenleber nach Verfütterung von Diäthylnitrosamin. Z Krebsforsch 82, 191-208 (1974).

SCHMÄHL,D.: Combination effects in chemical carcinogenesis.(Experimental results). Oncology 33, 73-76 (1976).

SCHMÄHL,D.; PREUSSMANN,R.: Canzerogene Wirkung von Nitrosodimethylamin bei Ratten. Naturwissenschaften 46, 175 (1959).

SCHNEIDER,J.; WARZOK,R.; OSSKE,G.; POETZSCH,H.D.: Fehlender canzerogener Effekt nach Gabe von Aminen bzw. Amiden und Nitrit an Kaninchen. Exp Pathol (Jena) 13, 78-80 (1977).

SCHÜPPEL,R.: Die Stickstoff-Demethylierung am Phenazon (Antipyrin). Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 255, 71-72 (1966).

SCHUSTER,J.: Beeinflussung der hepatocarzinogenen Wirkung von DÄNA bei Wistar-Ratten durch simultane DDT Applikation.
Dissertation Tübingen 1978.

SCHWARZ,M.; APPEL,K.E.; RICKART,R.; KUNZ,H.W.: Effect of DMN, Phenobarbital and Halothane on the sedimentation characteristics of rat liver DNA.
Arch Toxicol, Suppl 2, 479-482 (1979).

SCHWEINSBERG,F.; SANDER,J.: Canzerogene Nitrosamine aus einfachen aliphatischen tertiären Aminen und Nitrit.
Hoppe Seylers Z Physiol Chem 353, 1671-1676 (1972).

STAFFORD,M.; KELLERMANN,G.; STILLWELL,R.N.; HORNING,M.G.: Metabolism of antipyrine by the epoxide-diol pathway in the rat, guinea pig and human.
Res Commun Chem Pathol Pharmacol 8, 593-6o6 (1974).

STÖCKLE,G.: Morphometrische Analysen präneoplastischer, ATPase freier Zellareale zur Frühbeurteilung der hepatocarzinogenen Wirkung von DÄNA und deren Beeinflussung durch Fremdstoffe.
Dissertation Tübingen 1979.

TANNENBAUM,S.R.; SINSKEY,A.J.; WEISMAN,M.; BISHOP,W.: Nitrite in human saliva. Its possible relationship to nitrosamine formation.
J Natl Cancer Inst 53, 79-84 (1974).

TAYLOR,H.W.; LIJINSKY,W.: Tumor induction in rats by feeding aminopyrine or oxytetracycline with nitrite.
Int J Cancer 16, 211-215 (1975).

TAYLOR,H.W.; LIJINSKY,W.; NETTESHEIM,P.; SNYDER,C.M.: Alteration of tumor response in rat liver by carbon tetrachloride.
Cancer Res 34, 3391-3395 (1974).

TERRACINI,B.; MAGEE,P.N.; BARNES,J.M.: Hepatic pathology in rats on low dietary levels of DMNA.
Br J Cancer 21, 559-565 (1967).

WACHSTEIN,M.; MEISEL,E.: On the histochemical demonstration of glucose-6-phosphatase.
J Histochem Cytochem 4, 592 (1956).

WACHSTEIN,M.; MEISEL,E.: Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiological pH with special reference to the demonstration of the bile canaliculi.
Am J Clin Pathol 27, 13-23 (1957).

WACHSTEIN,M.; MEISEL,E.: Histochemical demonstration of mitochondrial adenosine triphosphatase with the lead-adenosine triphosphatse technique.
J Histochem Cytochem 8, 387-388 (196o).

WASSERMAN,A.E.; FIDDLER,W.; DOERR,R.C.; OSMAN,S.F.; DOOLEY,C.J.: DMNA in frankfurters.
Food Cosmet Toxicol 1o, 681-684 (1972).

WEBER,G.; CANTARO,A.: Gluc-6-Pase activity in normal, precancerous and neoplastic tissues.
Cancer Res 15, 1o5-1o8 (1955).

WOLFF,I.A.; WASSERMAN,A.E.: Nitrates, nitrites and nitrosamines.
Science 177, 15-19 (1972).

ZALDIVAR,R.: Geographic pathology of oral, esophageal, gastric and intestinal cancer in Chile.
Z Krebsforsch 75, 1-13 (197o).

ZALDIVAR,R.: Nitrate fertilizers as environmental pollutants: positive correlation between nitrates ($NaNO_3$ and KNO_3) used per unit area and stomach cancer mortality rates.
Experientia (Basel) 33, 264-265 (1977).

ZALDIVAR,R.; ROBINSON,H.: Epidemiological investigation on stomach cancer mortality in chileans. Association with nitrate fertilizer.
Z. Krebsforsch 8o, 289 (1973).

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren und Dozenten:

Adam, Apitz, Arnold, Aulhorn, Bachmann, Bader, Benöhr, Bentrup, Berg, Betz, Bichler, Bierich, H.E.Bock, K.W.Bock, Bohle, Bolt, Braun, Breuninger, Breyer-Pfaff, Cain, Dölle, Domres, Driesen, Durst, Eggstein, Feine, Feneis, Fichtner, Fischbach, Fischer, Flach, Frommhold, Geisbe, Gekeler, Geppert, Gerth, Göbel, Graumann, Greim, Grell, Guglielmi, Gupta, Haasis, Haberlandt, Habermalz, Hammacher, Harms, Haselmann, Hayduk, Heimann, Helms, Heni, Hilpert, Hirsch, Hoffmeister, Jacob, Jeschke, Junger, Kallee, Kidess, Kieninger, Kochsiek, König, Koslowski, Kummer, Kunz, Kretschmer, Krüger, Larbig, Lempp, Lenz, Lüders, Malchow, Mallach, Mau, Mayer, Mentzel, Meyer, Michaelis, Mörike, Ochsenfahrt, Oldenkott, Peiffer, Pfaff, Pflug, Plester, Probst, Reichenmiller, Riethmüller, Ritter, Roemer, Rössler, Rüdorff, Ruoff, Sander, Sasse, Schaude, Schindler, Schneider, Schoenemann, Schorer, Schubert, Schweizer, Schwemmle, Seif, Sewing, Siess, Staak, Stähler, Steinbach, Stunkat, Uehleke, Ullmann, Veihelmann, Völter, Waller, Weichart, Weitzel, Weser, Wessing, Winne.

Lebenslauf

Am 19. November 1951 wurde ich, Erich Paul Gmähle, als erstes Kind des Schriftsetzermeisters Erich Gmähle (verstorben 1977) und der Lore Hess in Ludwigsburg geboren.

Nach vierjährigem Besuch der Volksschule in Tamm (Württ.) und Stuttgart-Bad Cannstatt und neunjähriger Schulausbildung im Gymnasium in Bad Cannstatt und Waiblingen, legte ich dort 1971 die Reifeprüfung ab.

Ab dem Sommersemester 1972 studierte ich in Tübingen Medizin, wo ich 1973 das Vorphysikum
1974 das Physikum
1975 den ersten
1977 den zweiten und
1978, am 23. Oktober den dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung bestand.

Ab Oktober 1977 arbeitete ich als Internatsstudent je vier Monate auf der inneren, gynäkologisch-geburtshilflichen und chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Böblingen.

Die vorliegende Dissertation fertigte ich im Institut für Toxikologie der Universität Tübingen in der Zeit von 1976 bis 1978 an.